

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Růžena Maroušková

Vliv analogů hemu na strukturu a konformační stabilitu cytochromu b_5
Effect of heme analogs on structure and conformational stability of cytochrome b_5

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Václav Martínek, Ph.D.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 30.8.2011

.....

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala především svému školiteli RNDr. Václavu Martínkovi, Ph.D. za ochotu, trpělivost a cenné rady, které mi poskytl při vypracování této bakalářské práce.

Dále děkuji RNDr. Věře Černé, Ph.D. za poskytnutí izolovaných frakcí cytochromu b_5 a v neposlední řadě celému kolektivu laboratoře za pomoc a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Tato bakalářská práce vznikla na katedře biochemie PřF UK v Praze za podpory grantu Grantové agentury České republiky 203/09/0812.

Abstrakt

Cytochrom b_5 je součástí systému oxidas se smíšenou funkcí (MFO systému), který se podílí na metabolismu řady endogenních i exogenních látek. Jeho funkce je úzce spjata s dalším významným enzymem tohoto systému – cytochromem P450. Cílem této bakalářské práce bylo prozkoumat, jak analogy hemu ovlivňují strukturu a konformační stabilitu cytochromu b_5 . Ke studiu byla použita v laboratoři dosud nezavedená metoda – pulzní proteolýza, která využívá štěpení proteinu v různých koncentracích močoviny. Protein byl štěpen nespecifickou proteasou thermolysinem, která je aktivní i v prostředí s vysokou koncentrací močoviny. Pro studium stability cyt b_5 byly připraveny holoformy cytochromu b_5 obsahující hem a jeho analogy, kde jsou místo železitých iontů vázány ionty Mn^{3+} , Cr^{3+} či Co^{3+} . Analogy cytochromu b_5 byly připraveny pomocí titrace apoformy cytochromu b_5 heminem a jeho analogy. Pulzní proteolýza byla provedena i s apoformou cytochromu b_5 a výsledky byly vyhodnoceny za použití elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného.

Klíčová slova: elektroforéza, proteolýza, cytochrom b_5 , stabilita.

Abstract

Cytochrome b_5 is a component of the system of mixed function oxidases (MFO system) participating in metabolism of many endogenous and exogenous substances. Its main function in MFO system is reduction of cytochrome P450. The first aim of the thesis was to employ the pulse proteolysis to evaluate the influence of heme analogs on structure and conformational stability of cytochrome b_5 . This method utilizes the cleavage of protein by nonspecific protease (thermolysin) what is active even in the medium with high concentration of urea. Four forms of cytochrome b_5 , reconstituted with protoporphyrine IX containing Fe^{3+} , Mn^{3+} , Cr^{3+} or Co^{3+} ions, were prepared using titration of apocytochrome b_5 with hemin or its analogs. The stability of individual forms of cytochrome b_5 was then compared with apocytochrome b_5 using pulse proteolysis. Finally, the relative amounts of residual cytochrome b_5 were determined by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

Key words: electrophoresis, proteolysis, cytochrome b_5 , stability.

(In Czech)

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	7
1. ÚVOD	9
1.1 Metabolismus cizorodých látek.....	9
1.1.1 Fáze biotransformace	9
1.2 Cytochrom P450.....	11
1.2.1 Reakční cyklus cytochromu P450.....	13
1.2.2 Interakce mezi cytochromem P450 a cytochromem b_5	15
1.3 Cytochrom b_5.....	15
1.3.1 Funkce cytochromu b_5	17
1.4 Hem	19
1.5 Studium stability proteinů.....	20
1.5.1 Pulzní proteolýza	21
2. CÍLE	23
3. MATERIÁL A METODY	24
3.1 Použitý materiál a chemikálie	24
3.2 Použité přístroje	25
3.3 Metody	26
3.3.1 Příprava roztoků metalo-protoporfyrinů IX	26
3.3.2 Titrace apoformy cytochromu b_5 heminem - absolutní spektra	26
3.3.3 Titrace apoformy cytochromu b_5 metalo-protoporfyriny IX - diferenční spektra	26
3.3.4 Pulzní proteolýza	28
3.3.5 Elektroforéza SDS-PAGE.....	29
3.3.6 Kvantifikace proteinu v gelu.....	31
4. VÝSLEDKY	33
4.1 Rekonstituce apo-cyt b_5 s metalo-protoporfyriny IX.....	33
4.1.1 Titrace apoformy cytochromu b_5 heminem - absolutní spektra	33
4.1.2 Určování koncentrace cytochromu b_5 z diferenčních spekter	34
4.1.3 Spektra metalo-protoporfyrinů IX volných v roztoku a vázaných na apoformu cyt b_5	36
4.1.4 Orientační porovnání rychlostí inkorporace protoporfyrinů IX do apoformy cyt b_5	39

4.2	Vliv prosthetické skupiny na konformační stabilitu cytochromu b_5	40
4.2.1	Určení C_m apo- a holoformy cytochromu b_5 pomocí pulzní proteolýzy	40
4.2.2	Porovnání vlivu prosthetické skupiny na konformační stabilitu cytochromu b_5	42
5.	DISKUSE	45
6.	ZÁVĚR	47
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	48

Seznam použitých zkratk a symbolů

apo-cyt b ₅	apoforma cytochromu b ₅
A0 - A8	vzorky apoformy cytochromu b ₅ s molární koncentrací močoviny, v jaké byl vzorek preinkubován a následně podroben pulzní proteolýze
b5R	NADH : cytochrom b ₅ reduktasa
BCA	4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina
BIS	N,N-methylen-bis-akrylamid
BSA	hovězí sérový albumin
CBB	Coomassie Brilliant Blue
C _m	koncentrace denaturačního činidla v inflexním bodě („midpoint of the urea-induced unfolding transition“)
CPR	NADH : cytochrom P450 reduktasa
CYP	cytochrom P450
cyt b ₅	cytochrom b ₅
cyt P450	cytochrom P450
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinadeninmononukleotid
H0 – H8	vzorky holoformy cytochromu b ₅ s molární koncentrací močoviny, v jaké byl vzorek preinkubován a následně podroben pulzní proteolýze
K1	kontrolní roztok pro pulzní proteolýzu bez obsahu apo- nebo holoformy cytochromu b ₅
KA	kontrolní roztok pro pulzní proteolýzu obsahující apoformu cytochromu b ₅

K _d	disociační konstanta
KH	kontrolní roztok pro pulzní proteolýzu obsahující holoformu cytochromu b ₅
MFO systém	mikrosomální systém oxidas se smíšenou funkcí („mixed function oxidases”)
NADH	nikotinamidadenindinukleotid (redukovaný)
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukovaný)
NMR	nukleární magnetická resonance
RH	substrát
ROH	oxygenovaná (hydroxylovaná) forma substrátu
rpm	otáčky za minutu („Revolutions Per Minute“)
SDS – PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného („sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis”)
UV	ultrafialové záření
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
TRIS	2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol
VIS	viditelné záření
VZ1 – VZ4	vzorky frakcí cytochromu b ₅ (viz kapitola 3.1)
WR	standard pro SDS-PAGE

1. Úvod

1.1 Metabolismus cizorodých látek

Cizorodé látky (neboli xenobiotika) jsou sloučeniny, které se běžně nevyskytují v lidském organismu. Nejsou důležité pro jeho zdravý vývoj a ani neslouží jako zdroj energie. Do těla se dostávají trávicím ústrojím, respiračním systémem či pokožkou jakožto látky obsažené v potravě, ovzduší apod. Z fyzikálně-chemických vlastností jsou pro možnost poškození organismu významné zejména rozpustnost ve vodě a organických rozpouštědlech, těkavost u kapalin a reaktivita. Osud xenobiotika v těle závisí také na stupni polaritě molekuly. Epitely buněk obsahují vysoké množství lipidů – látky lipofilní povahy mají tudíž značně usnadněn vstup do organismu a takovéto látky se mohou v organismu hromadit [1,2].

Pomocí enzymů jsou xenobiotika přeměňovány na polárnější produkty, které mohou být vyloučeny a nedochází tak k bioakumulaci příslušných xenobiotik. Vedle detoxikace těchto sloučenin, může dojít k vytvoření biologicky aktivnějších derivátů. V horším případě vznikají látky toxické, mutagenní či karcinogenní. Naopak mezi žádoucí deriváty patří aktivní formy některých léčiv [3]. U léčebných přípravků se využívá toho, že daná molekula léku je analogická sloučenině plnící v organismu fyziologickou funkci. Tudíž do buněk vstupuje pomocí stejných kanálů (přenašečů) a prochází podobnými mechanismy [1].

1.1.1 Fáze biotransformace

Během evoluce se u jednotlivých organismů vyvinulo mnoho detoxikačních mechanismů. Tyto procesy jsou důležité pro zachování jedince, neboť při vysoké koncentraci nebo dlouhodobém působení toxické látky dochází k ireverzibilnímu poškození organismu vedoucí k jeho zániku. U eukaryotických buněk rozlišujeme 2 hlavní fáze biotransformace [1]. V té první dochází ke zvýšení polaritě xenobiotika. Látky se přeměňují oxidačními a redukčními reakcemi či hydrolýzou [4]. Hlavním enzymovým

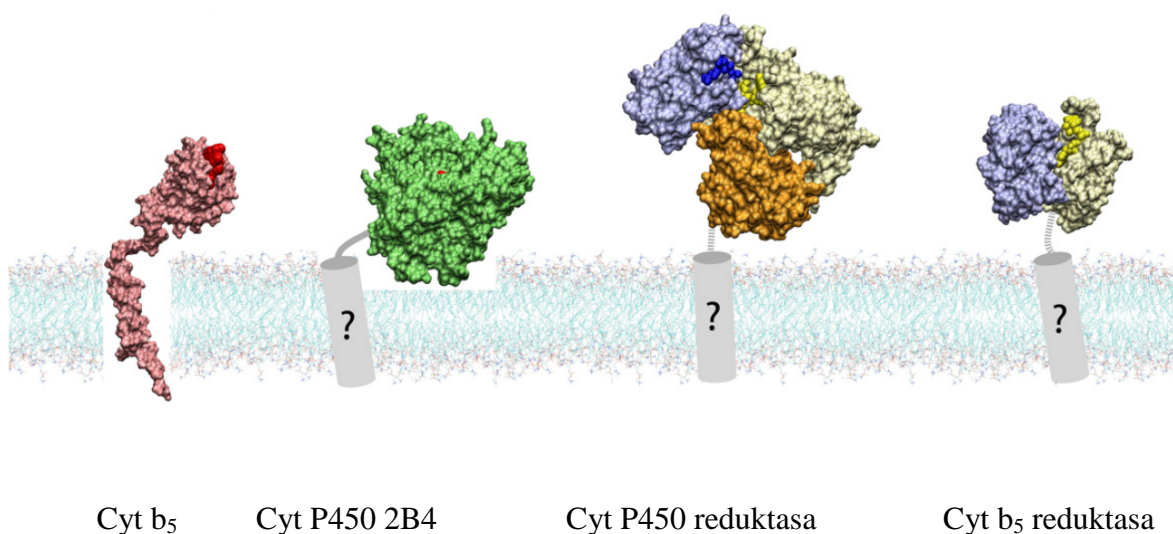
systémem I. fáze biotransformace je mikrosomální systém oxidas se smíšenou funkcí (MFO systém) [2].

MFO systém (z angl. „mixed function oxidases”) je systém využívající především molekulární kyslík ke katalýze řady oxidačních, oxygenačních, popřípadě redukčních reakcí. Skládá se ze tří základních částí:

- NADPH:cytochrom P450 reduktasa (CPR) – flavoproteinový enzym sloužící k rozdělení elektronového páru
- cytochrom P450 (cyt P450) – hemthiolátový enzym
- biologická membrána

Fakultativně může MFO systém obsahovat také cytochrom b_5 (cyt b_5) a NADH:cytochrom b_5 reduktasu (b_5R) [2]. Srovnání enzymů je na **Obr. 1**.

Biologická membrána se skládá z lipidů, jež způsobují konformační změny cyt P450 zvyšující jeho afinitu k substrátu [2].



Obr. 1: Modelové struktury cyt b_5 , cyt P450 a jejich reduktas. Modely byly vytvořeny pomocí NMR, při kterém se měřila zejména solubilní část enzymů. Barevně odlišené části značí: cyt b_5 (růžová), hem (červená), NADPH (modrá), NAD(P)H-vázající doména (světle modrá), FAD (žlutá), FAD-vázající doména (světle žlutá), FMN-vázající část (oranžová). Upraveno dle [5].

II. fáze biotransformace se účastní reakcí, které také napomáhají xenobiotiku či endogenní látce vylučování z těla. Jedná se o fázi konjugací. Nazývá se tak proto, jelikož

molekula derivatizovaná v první fázi biotransformace podléhá konjugaci s polárními endogenními látkami za vzniku ještě více polární sloučeniny. Mezi hlavní látky podílející se na konjugaci xenobiotik patří kyselina glukuronová, glutathion, aktivní sulfát, cystein, glycin atd. V této fázi opět pomáhají enzymy (jiné než v I. fázi). Většinou to jsou transferasy jako UDP-glukuronosyltransferasa, glutathion-S-transferasa, sulfotransferasa apod. [6].

V klinické farmakologii je větší pozornost věnována enzymům I. fáze biotransformace, neboť ty se více zapojují do přeměn léků [6]. Procento léků ovlivněných cyt P450 je až okolo 70 % [5].

V některých publikacích se v návaznosti na I. a II. fázi biotransformace uvádí ještě III. fáze. Při ní dochází k aktivaci membránových přenašečů [4].

1.2 Cytochrom P450

Cyt P450 představují všudypřítomnou superrodinu enzymů vyskytující se v tisících genech bakterií, hub, rostlin a živočichů. V přírodě můžeme najít přes tisíc forem cyt P450. Jejich počet v organismech se liší nejen podle druhu organismu, ale i individuálně [7]. V posledních letech se věda zaměřila více na zkoumání lidských cyt P450, kterých bylo dosud nalezeno 57 forem [4]. Nejvíce jich můžeme nalézt v jaterních buňkách, ale nemalé množství se nachází také v plicích, ledvinách, tenkém střevě, kůži, mozku, nadledvinkách. V buňkách jsou umístěny převážně v membránách hladkého endoplasmatického retikula, některé se objevují i jako součást membrán mitochondrií. [3].

Název cytochrom P450 je odvozen ze spektrometrických měření tohoto enzymu. Číslo „450“ je označení spektrálního maxima, které vykazuje cyt P450 po redukci a vazbě s CO, písmeno „P“ v jeho názvu znamená „peak“ [8].

Cytochrom P450 může také vyjadřovat zkratka CYP, k níž se přidává arabské číslo označující číslo rodiny cytochromů – např. CYP21. Číslo je zvolené libovolně nebo označuje nějakou souvislost s funkcí enzymu. Zde uvedený příklad CYP21 vystupuje jako steroid 21-hydroxylasa [9].

S rostoucím počtem objevených forem cyt P450 se začalo používat systematické názvosloví. Cyt P450 shodující se v aminokyselinové sekvenci minimálně z 40% se řadí mezi tzv. rodinu. Dále se enzymy dělí na tzv. podrodiny – značené velkými písmeny. Zde

už se sekvence enzymů shoduje více jak z 55%. Konkrétní cytochrom nese na konci názvu číslici [9].

Např. CYP 3A4 je členem podrodiny A náležící do enzymové rodiny 3. Jeho struktura je zobrazena na **Obr. 2**. Tento cytochrom je pro organismus velmi významný, neboť se začleňuje do metabolismu okolo poloviny dnes užívaných léků (například terfenadinu či warfarinu) a podílí se na oxidaci karcinogenních a endogenních látek (steroidy) [10,11].



Obr. 2: Cytochrom P450 3A4 – celková struktura cyt P450 3A4 vyřešená pomocí NMR. Modře jsou označené části N konce, žlutě, zeleně a červeně části C konce proteinu. Uprostřed je znázorněná molekula hemu. Převzato z [12].

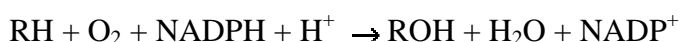
Cyt P450 se řadí mezi hemoproteiny. Porfyrinový skelet (protoporfyrin IX) se na protein částečně váže hydrofobními silami a zároveň prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu, která je přítomna v aktivním centru enzymu jako pátý ligand železa protoporfyrinu IX. Toto uspořádání umožňuje výjimečné chování těchto hemoproteinů a odlišuje je od ostatních hemoproteinů jako hemoglobinu apod. (odlišné spektrální a katalytické vlastnosti). Šestým ligandem může být atom kyslíku molekuly vody [3] - viz **Obr. 3** na str. 14.

Cyt P450 ovlivňují metabolismus jak xenobiotik, tak endogenních látek. V lidském těle se podílí hlavně na reakcích I. fáze biotransformace [13], mohou se však účastnit také biosyntézy nízkomolekulárních látek majících regulační funkci v mnoha úrovních metabolismu steroidů, prostaglandinů, tromboxanů, mastných kyselin, derivátů retinové kyseliny atd. [9].

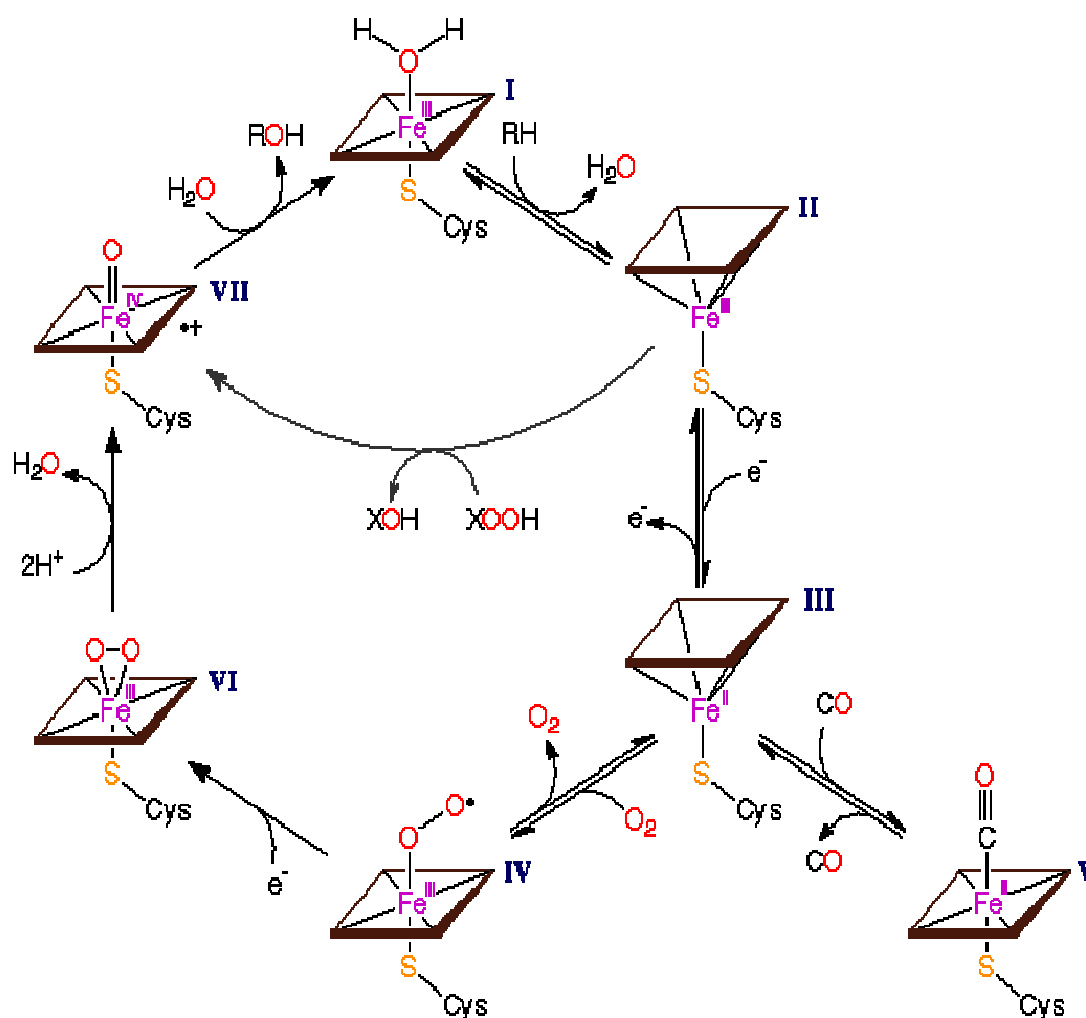
Všechny cyt P450 mají oxidační účinky na jejich substráty, ale navzájem se liší substrátovou specifitou. Některé oxidují jen úzký soubor podobných substrátů, jiné přeměňují poměrně široký rozsah látek. Ty, co mají omezenou substrátovou specifitu, se podílí hlavně na biosyntéze či degradaci sterolů a jiných endogenních látek. Na druhé straně na metabolismu xenobiotik se podílí zhruba ¼ forem lidských cyt P450. U léků mohou snížit jejich aktivitu, vyvolat detoxikaci látky nebo zvýšit toxicitu substancí obsažených v léku. [5].

1.2.1 Reakční cyklus cytochromu P450

Nejběžnější reakcí katalyzovanou cyt P450 je monooxygenasová reakce. Její schéma je znázorněno na **Obr. 3** na str. 14. Cyt P450 spolupůsobí mj. i s dalším enzymem nacházejícím se v endoplasmatickém retikulu – CPR nebo b5R. Cyklus můžeme sumarizovat níže uvedenou rovnicí (RH je substrát a ROH je oxygenovaná (hydroxylovaná) forma substrátu):



Cyt P450 obsahuje v klidovém stavu železo s oxidačním číslem III, na něž je jako šestý ligand navázán atom kyslíku molekuly vody. Železo je tedy hexakoordinované (v nízkospinovém stavu). V přítomnosti substrátu se z cyt P450 uvolňuje voda a dochází ke konformačním změnám v molekule enzymu. V dalším kroku interaguje cyt P450 s CPR, čímž hemové železo získává oxidační číslo II. Železo zůstává pentakoordinované (vysokospinový stav) a je schopné vázat molekulový kyslík nebo jiné ligandy. Za účasti CPR nebo (b5R) dochází ke vzniku peroxykomplexu (krok IV → VI). Následující krok naznačuje štěpení vazby mezi atomy kyslíku, přičemž jeden atom kyslíku přijme 2 protony za tvorby vody a druhý atom kyslíku zůstává vázaný na železo. Tento ferrioxenový komplex je stabilizován mezomerním posunem elektronu z thiolátové síry na kyslík. V konečném kroku je z enzymu uvolněn oxidovaný substrát a obnovuje se nativní forma cyt P450. Z tohoto cyklu tedy vyplývá, že cyt P450 je schopný přijmout 2 elektrony. První elektron (krok II → III) pochází z CPR, zatímco druhý elektron (krok IV → VI) může být od CPR i b5R [3,14].

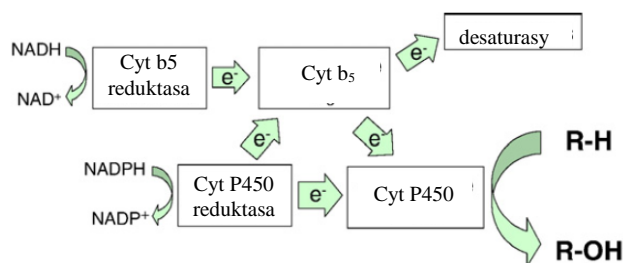


Obr. 3: Cyklus monooxygenasové reakce cytochromu P450. Převzato z [15].

V tomto cyklu jsou dále znázorněny 2 další reakce, k nimž může docházet. V přítomnosti peroxidů a peroxikyselin (sloužící jako donory kyslíku) může z komplexu II vznikat komplex VII. Tato reakce se označuje jako peroxidasová aktivita [3,14]. Navázáním oxidu uhelnatého na komplex III se může vytvořit komplex V, který vystupuje jako inhibitor monooxygenasové reakce cyt P450 [15].

1.2.2 Interakce mezi cytochromem P450 a cytochromem b₅

Oxidace endo- a xenobiotických látek probíhající v játrech je umožněna díky složitému přenosu elektronů z jiných bílkovin na cyt P450. **Obr. 4** je ukázkou, jak cyt P450 získávají elektrony. Zdrojem elektronů jsou NADPH (nikotinamidadenindinukleotidfosfát) a NADH (nikotinamidadenindinukleotid), které redukují CPR a b5R. Tyto 2 enzymy dále předávají elektrony na cyt P450 a cyt b₅. Pokud cyt P450 přijme elektron, je schopný oxidovat substrát označený na Obr. 4 jako „R-H“. V endoplasmatickém retikulu se vyskytují cyt P450 a cyt b₅ v poměru přibližně 1:1, zatímco pouze na jednu CPR připadá deset až dvacet cyt P450 [5].



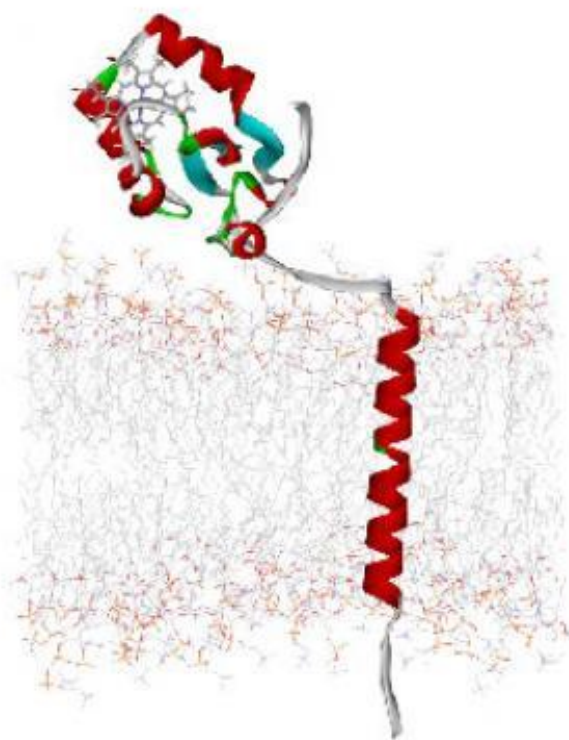
Obr. 4: Schématické znázornění interakcí mezi cytochromem P450, cytochromem b₅ a jejich reduktasami. Upraveno dle [5].

1.3 Cytochrom b₅

Součástí membrány endoplasmatického retikula je také cyt b₅ s molekulární hmotností 16 kDa [14]. Tento protein se objevil v průběhu evoluce velmi brzy a vyskytuje se u mnoha organismů [16]. Heterologní exprese cyt b₅ v buňkách bakterie *Escherichia coli* ulehčila získání těchto enzymů pro studium jejich funkcí, struktury nebo mutagenese [5].

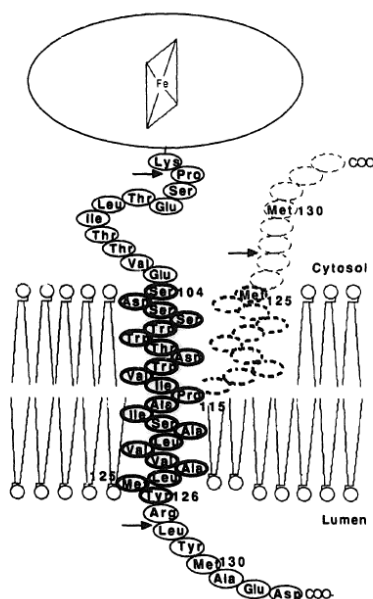
Cyt b₅ je kyselý povahy a jeho strukturu tvoří 6 α -helixů a 5 struktur skládaného listu. Skládá se ze dvou částí (viz **Obr. 5**). Jedna z nich je větší a zasahuje do cytosolu buňky. Tato hydrofilní N-terminální doména váže molekulu hemu a je u různých savčích druhů poměrně konzervovaná. Jejich aminokyselinové sekvence se shodují nejméně z 80 %. Jako 5. a 6. ligand hemu jsou na železo navázány 2 histidiny. Cyt b₅ je tak ochráněn před přímou interakcí s molekulárním kyslíkem. Druhá menší hydrofobní doména je zakotvena do buněčné membrány C-terminálním koncem. Tím se liší od ostatních enzymů

MFO systému (b5R, cyt P450, CPR), které jsou ukotveny v membráně pomocí N-terminální kotvy. Dvě domény se spojují pomocí flexibilní spojky o délce 15 aminokyselin, která je dost pohyblivá, aby se cyt b₅ mohl vázat k různým proteinům, s nimiž tvoří redoxní systém, a přitom zůstal ukotvený v membráně [16-18]. Proteasy (př. trypsin) jsou schopné štěpit cyt b₅ mezi dvěma doménami za uvolnění rozpustné hem obsahující části molekuly [16].



Obr. 5: Lidský cytochrom b₅. Cyt b₅ se skládá z 2 domén – solubilní část zasahuje do cytosolu a je připojena přes flexibilní spojku k membránové kotvě mající α -helixovou strukturu. Převzato z [19].

Hydrofobní doména může být v membráně ukotvena dvěma způsoby znázorněnými na **Obr. 6**. První model předpokládá, že membránová kotva prochází celou membránou a C-terminální konec se nachází v lumenu endoplasmatického retikula. Tento model je více pravděpodobný. Ve druhém modelu se mění konformace na místě prolinu 115 a C-terminální konec směřuje do cytosolu [5,18].



Obr. 6: Znázornění dvou možných konformací membránové kotvy. C-terminální konec se může vyskytovat buď v lumen endoplasmatického retikula (plnou čarou) nebo v cytosolu buňky (čárkovaně). Způsob ukotvení hydrofobní domény závisí na konformaci v místě prolinu 115. Převzato z [18].

Kromě již popsaného mikrosomálního cyt b_5 existují u savců ještě další 2 formy cyt b_5 - mitochondriální forma, jež je zakotvená v membráně mitochondrií, a solubilní forma v erythrocytech. Při porovnávání hem vázající části mitochondriálního a mikrosomálního cyt b_5 a jejich sekvence aminokyselin se došlo k výsledku, že se jejich aminokyselinová sekvence shoduje pouze z 58 %. Proto se dá říct, že tyto 2 proteiny pochází z 2 různých genů [18]. Mikrosomální a solubilní forma v erythrocytech pochází ze stejného genu. Mikrosomální cyt b_5 se tvoří na volných ribosomech a nese na svém konci 10 aminokyselinových zbytků, jež předurčují umístění cyt b_5 v membráně endoplasmatického retikula [17].

1.3.1 Funkce cytochromu b₅

V kapitole 1.2.2 byl zmíněn vztah mezi cyt b_5 a dalšími enzymy MFO systému. Cyt b_5 slouží jako přenašeč elektronů nejen mezi již zmíněnými enzymy, ale také mezi reduktasami a dalšími oxidativními enzymy. Cyt b_5 může například přijmout elektrony od CPR i b_5R a může je přenést na jiné proteiny schopné přijmout elektron jako je cytochrom c , metmyoglobin a methemoglobin [16].

V závislosti na konkrétním typu cyt P450, substrátu a popřípadě experimentálních podmínkách ovlivňuje cytochrom b_5 katalytické účinky cytochromu P450. Katalytické reakce mohou být vlivem cyt b_5 stimulované, inhibované nebo neovlivněné. Např. při studiu cyt P450 a jeho dvou substrátů – methoxyfluranu a benzfetaminu se zjistilo, že anestetikum methoxyfluran vyžaduje pro svou biotransformaci cyt b_5 , zatímco benzfetamin je přítomností cyt b_5 ovlivňován minimálně [20]. Stimulovaná katalytická reakce cyt P450 může být ovlivněna působením cyt b_5 : (i) přímým přenosem elektronu z cyt b_5 na cyt P450 nebo (ii) prostřednictvím allostेरických modulací reakcí katalyzovaných cytochromem P450 [21]. Nedávnými studiemi bylo zjištěno, že cyt b_5 může měnit nejen množství přeměněného cytochromem P450 ovlivněného substrátu, ale také typ produktu, který přeměnou vzniká [22].

Jaterní mikrosomální cyt b_5 je proměnlivý protein schopný reagovat na vnitřní i vnější regulační signály. Při onemocnění zvaném hypothyreodismus roste koncentrace cyt b_5 v játrech. Naopak jeho hladina u křečků klesala po podávání ethanolu [16].

Jednou z dalších schopností cyt b_5 je spoluúčast na biosyntéze lipidů, zejména jejich spojením s desaturasami, které syntetizují nenasycené mastné kyseliny u rostlin a zvířat aerobní cestou. Mikrosomy savců obsahují alespoň 3 desaturasy – $\Delta 5$, $\Delta 6$ a $\Delta 9$ desaturasy. Symbol Δ označuje, na kolikátém atomu od karboxylové skupiny mastných kyselin dojde k vytvoření dvojné vazby. Například desaturasa $\Delta 9$ tvoří dvojnou vazbu mezi 9. - 10. uhlíkem nasycené stearové a palmitové kyseliny. Savci nejsou schopni tvořit dvojnou vazbu za 10. uhlíkem mastných kyselin, proto je pro ně kyselina linolová ($\Delta 9$; $\Delta 12$) a linolenová ($\Delta 9$; $\Delta 12$; $\Delta 15$) esenciální [18].

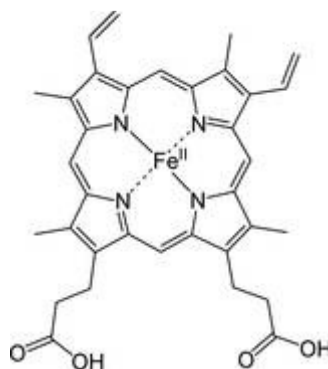
Cyt b_5 se v mikrosomech účastní vzniku cholesterolu z lanosterolu nebo biosyntézy sialové kyseliny [18].

Solubilní forma cyt b_5 slouží v erytrocytech jako redukční činidlo methemoglobinu. Tím se methemoglobin (obsahující železitý kation, nevázející kyslík) vrací na funkční protein hemoglobin, který je schopný přenášet kyslík. Methemoglobin se běžně tvoří v krevním oběhu každý den přeměnou asi 3 % hemoglobinu. Nedostatek solubilního cyt b_5 v erytrocytech může být příčinou onemocnění methemoglobinémie. [18].

1.4 Hem

Hem se vyskytuje jako prosthetická skupina v hemoproteinech. Cyt b_5 obsahuje konkrétně hem b (ferroprotoporfyrin IX). Komplexotvornou složku hemu tvoří porfyrin. Porfyrin hemu b se skládá z porfinu (čtyř molekul pyrrolu spojených čtyřmi methylenovými můstky) a jeho substituentů v následujícím pořadí: methyl, vinyl, methyl, vinyl, methyl, propionát, propionát, methyl. Cyklus je rovinný a díky delokalizovaným π -elektronovým párům má aromatický charakter [23].

Heterocyklický kruh porfyrinu je slabá dvojsytná kyselina, a proto se v bazickém prostředí na atomy dusíku mohou koordinační vazbou vázat různé kovy. Nejstabilnější jsou porfyrinové komplexy železa – ty se nachází v hemu. Pokud se v komplexu železo vyskytuje s oxidačním číslem II, mluvíme o ferroprotoporfyrinech IX (hem). Jeho oxidací vzniká komplex, kde má železo oxidační číslo III a tento komplex se poté nazývá ferriprotoporfyrin IX (někdy označovaný jako hemin) [23]. Struktura hemu je ukázána na **Obr. 7**.



Obr. 7: Hem. Porfyrinový cyklus je planární, ion železa je uložen téměř v téže rovině. Hem je konjugovaný systém, takže ačkoli jsou dvě vazby Fe-N koordinačně kovalentní, ve skutečnosti jsou si všechny čtyři vazby s pyrroly rovny. Kolmo nad a pod rovinu hemového kruhu směřuje páté a šesté koordinační místo železa. Převzato z [24].

Nejstabilnější komplexy železa jsou oktaedrické. V dosud uvedených tetrakomplexech jsou tedy ještě dvě koordinační vazby, na které se snadno váží jeden až dva další ligandy prostřednictvím jejich volných elektronových párů. Jedním ligandem často bývá dusík imidazolového jádra histidinu [23]. V cyt P450 se jako 5. ligand váže atom síry z postranního řetězce cysteinu [15].

Ferroprotoporfyrin IX je prosthetickou skupinou cytochromů nezbytných pro katalýzu řadu redoxních dějů probíhajících v živých organismech, nebo např. v hemoglobinu a myoglobinu. V případě cytochromů je oxidace a redukce atomu železa podstatná pro jejich biologickou funkci. Naproti tomu oxidace Fe^{2+} myoglobinu nebo hemoglobinu má za následek zánik jejich biologické aktivity [25].

1.5 Studium stability proteinů

Struktura bílkovin se rozlišuje do několika úrovní. Primární struktura je dána pořadím aminokyselin v polypeptidovém řetězci. Na stabilizaci sekundárních struktur (α -helixu, struktury skládaného listu) mají vliv především vodíkové vazby. Terciární strukturou rozumíme vzájemné prostorové uspořádání atomů v řetězci polypeptidu. Některé bílkoviny jsou funkční až po spojení 2 a více podjednotek. Říkáme, že mají kvartérní strukturu. Celkové uspořádání bílkovin, v jakém se vyskytují v živém organismu, a které jim umožňuje vykonávat jejich funkci, nazýváme nativním stavem bílkovin. Na celkovém uspořádání bílkovin se podílí disulfidové vazby a dále nekovalentní interakce, mezi něž se řadí elektrostatické síly (solný můstek a van der Waalsovy interakce), vodíkové můstky a hydrofobní interakce. Změnou vnějších podmínek (teploty, pH, působením některých detergentů či chaotropních látek) se snižuje stabilita bílkovin a dochází k jejich denaturaci [26].

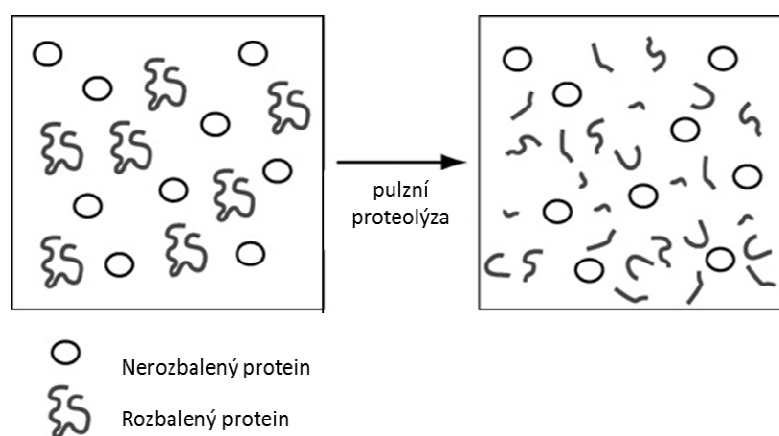
Na studium stability proteinů se můžeme dívat dvěma pohledy. Některé metody potřebují ke svému měření izolovaný protein a stabilita bílkovin je měřena víceméně přímo. Jedná se o metody jako např. vlastní fluorescence bílkovin založená na rozdílných fluorescenčních vlastnostech aromatických aminokyselin (především tryptofanu) mezi sbaleným a rozvolněným řetězcem či cirkulární dichroismus (měří opticky aktivní látky, které stáčí rovinu polarizovaného světla) [27,28]. Jejich nevýhodou však je obtížnost, s jakou se získávají čisté formy bílkovin. Jiné metody využívají odvozování vlastností bílkovin měřených za jejich fyziologických podmínek. Takové metody se nazývají deduktivní a řadí se mezi ně např. měření aktivity, schopnosti opětovného složení (renaturace) či pulzní proteolýza. Výhodou je, že u nich odpadá nutnost izolace proteinů, ale na druhou stranu tyto metody bývají méně univerzální (např. mnoho bílkovin nevykazuje enzymovou aktivitu). Studium bílkovin v hrubém lyzátu se stalo žádoucí

hlavně v posledních desetiletích, kdy se vyvinulo spousta studií využívajících místně cílenou mutaci bílkovin [28]. Záměna ba i jedné aminokyseliny v molekule bílkovin vede ke změnám charakteristik bílkovin, a ty pak mohou být hůře izolovatelné [29]. Přímé a deduktivní metody se prolínají.

Informace získané o stabilitě proteinů mohou být dále využity pro studium struktury a konformace proteinů nebo k monitorování interakcí protein-protein či protein-ligand [30].

1.5.1 Pulzní proteolýza

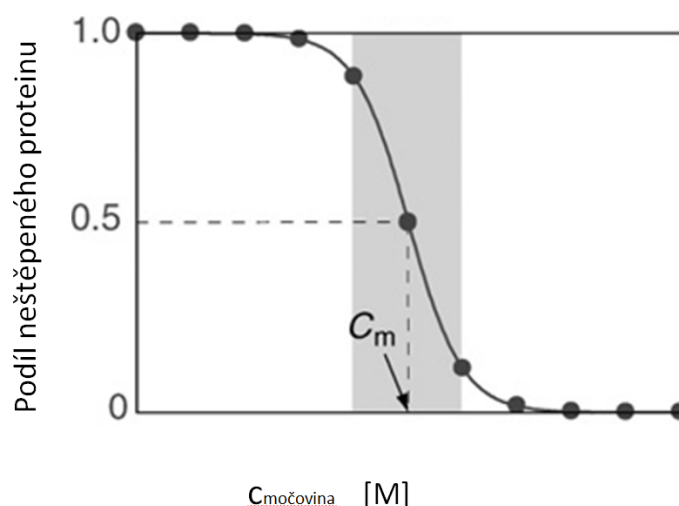
Pulzní proteolýza využívá fakt, že sbalený protein je vůči proteolýze odolnější než protein rozbalený. Roztoky daného proteinu jsou připraveny v různých koncentracích denaturačního činidla - močoviny. Dochází tak k rozvolňování molekul bílkovin v roztoku. Poté, co roztok dosáhne konformační rovnováhy, je roztok vystaven působení nadbytku proteasy po dobu, kdy jsou štěpeny pouze rozbalené molekuly proteinu, zatímco sbalené molekuly zůstávají zachované. Princip pulzní proteolýzy znázorňuje **Obr. 8**.



Obr. 8: Princip pulzní proteolýzy. V roztoku proteinu se působením močoviny nachází stejné množství rozbaleného a nerobaleného proteinu. Tyto dvě konformace proteinu reagují na přítomnost thermolysinu odlišně. Při správné době působení se pulzní proteolýzou rozštěpí pouze rozbalený protein. Upraveno dle [31].

Míra stability proteinů pak může být vyhodnocena za pomoci SDS-PAGE elektroforézy, po níž se vyhodnocuje optická denzita zóny odpovídající neštěpenému proteinu. Tato veličina je vynesena proti koncentraci denaturačního činidla za zisku obvykle sigmoidní denaturační křivky. Ukázka takové křivky je zobrazena na **Obr. 9**.

Mírou stability proteinu je koncentrace denaturačního činidla v inflexním bodě (značená v literatuře jako C_m). Okolo bodu C_m se nalézají tzv. přechodná zóna, ve které dochází k nejvyššímu poklesu podílu neštěpeného proteinu vlivem rostoucí koncentrace močoviny. Pro lepší určení C_m se provádí druhé měření, ve kterém se koncentrace močoviny v této zóně zvyšuje po menších částech, a tak se vytvoří více bodů na sigmoidě [29,31].



Obr. 9: Sigmoidní křivka znázorňující vliv koncentrace močoviny na podíl neštěpeného proteinu v roztoku, který dosáhl konformační rovnováhy. S rostoucí koncentrací močoviny dochází k většímu rozvolnění proteinu a také k rozsáhlejšímu štěpení molekul. Šedě je na obrázku zvýrazněna tzv. přechodová zóna. Upraveno dle [31].

Jelikož se stabilita vyhodnocuje pomocí SDS-PAGE, je k této metodě potřeba minimální množství proteinu. Pokud je k dispozici izolovaná bílkovina, může být k experimentu využito i méně než 100 μg proteinu. Navíc není třeba čisté bílkoviny a pulzní proteolýza může být stanovována v hrubém buněčném lyzátu obsahujícím protein.

Jako proteasa se často používá thermolysin. Jedná se o nespecifický enzym schopný katalýzy i za vysoce denaturujících podmínek, jeho aktivita rychle klesá až při koncentraci močoviny vyšší než 7 M [30]. Thermolysin štěpí zejména peptidové vazby spojující hydrofobní aminokyseliny. Enzym potřebuje ke správné funkci vápenaté kationty. Proto je nevhodné při pulzní proteolýze používat fosfátové pufrы, které by tvořily nerozpustné fosfáty vápenaté. Enzymová reakce thermolysinu se zastavuje pomocí EDTA [31].

2. Cíle

Hlavním cílem předkládané práce bylo ověřit potenciál pulzní proteolýzy při studiu vlivu analogů hemu na strukturu a konformační stabilitu cyt b₅. Dílčím cílem pak bylo optimalizovat metodiku titrace apo-cyt b₅ heminem také pro komplexy protoporfyrinu IX s Mn^{III}, Cr^{III} a Co^{III}. To zahrnovalo základní spektrální charakterizaci jednotlivých porfyrinů, a to jak volných v roztoku tak i vázaných na apo-cyt b₅. Dálším záměrem této práce bylo ověřit, že pulzní proteolýza bude schopná detekovat rozdíly v konformační stabilitě cyt b₅ způsobená absencí prosthetické skupiny hemu, tedy rozdíl ve stabilitě apo- a holoformy cyt b₅. A nakonec využít těchto rozdílů k porovnání konformační stability nově připravených derivátů (obsahujících Mn^{III}, Cr^{III} a Co^{III}) vzhledem k nativní formě cyt b₅ s heminem.

3. Materiál a metody

3.1 Použitý materiál a chemikálie

Frontier Scientific, Inc., USA

Mn^{III} protoporfyrin IX chlorid, Fe^{III} protoporfyrin IX chlorid (hemin), Co^{III} protoporfyrin IX chlorid, Cr^{III} protoporfyrin IX chlorid

Lachema Brno, Česká republika

Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), močovina

Lach-Ner, s.r.o., Česká republika

NaCl

Penta, Česká republika

NaOH

Sigma, USA

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIZMA, TRIS), Thermolysin P1512 (z bakterie *Bacillus thermoproteolyticus* rokko), Sigma Marker S8445 („wide range“, rozsah molekulových hmotností 6,5 – 200 kDa)

Ubichem

CaCl₂

Použité preparáty apo-cytochromu b₅

K dispozici byly následující 4 frakce králíčího apo-cyt b₅ uchované při teplotě -80 °C, poskytnuté RNDr. Věrou Černou, PhD.; všechny frakce byly připraveny heterologní expresí v bakterii *Escherichia coli* BL-21 (DE3) Gold

- VZ1, VZ2, VZ4: membránové formy
- VZ3: solubilní (nemembránová) forma

3.2 Použité přístroje

Předvážky:	EW 600-2M (Kern)
Analytické váhy:	Discovery (Ohaus)
Centrifuga:	MSE microCentaur (Schoeller - Sanyo) stolní minicentrifuga Gilson (GmC Lab)
Spektrofotometr:	Diod Array 8453 (Hewlett-Packard)
Inkubátor:	Thermomixer compact (Eppendorf)
pH metr:	model 370 (ATI Orion)
Magnetická míchačka:	KMO2 basic (IKA)
Vortex:	MS2 Minishaker (IKA)
Elektroforetická aparatura:	MiniVE Vertical (Amersham Biosciences)
Zdroj pro elektroforézu:	EPS 301 Electrophoresis Power Supply (Amerham Pharmacia Biotech)

Další přístroje: přístroj pro produkci ultračisté vody Simplicity 185 (Millipore), sonikátor ELMAsonic E30H (P-LAB), elektrický vařič (Eta), automatické pipety, Hamilton dávkovací stříkačky, křemenná kyveta o optické dráze 1 cm

3.3 Metody

3.3.1 Příprava roztoků metalo-protoporfyrinů IX

3,64 mg heminu bylo smícháno s 10 μ l 2 M NaOH. K tomu bylo postupně přidáno po 1 ml 50% ethanolu na celkový objem 5 ml. Po každém přidavku NaOH nebo ethanolu byl vzorek důkladně promíchán, aby se hemin rozpustil. Pro dobré rozpuštění byla použita i sonikační lázeň a horká vodní lázeň. Takto byl vytvořen 1 mM roztok heminu.

Analogicky byly připraveny 1 mM roztoky z následujících sloučenin: 3,45 mg Mn^{III} protoporfyrin IX chloridu, 3,48 mg Co^{III} protoporfyrin IX chloridu, 3,59 mg Cr^{III} protoporfyrin IX chloridu. Roztoky byly dále uchovávány při laboratorní teplotě ve skleněné lahvičce obalené alobalem.

3.3.2 Titrace apoformy cytochromu b_5 heminem - absolutní spektra

Jedna molekula apo-cyt b_5 váže 1 ligand heminu. Spektrofotometricky na spektrofotometru Hewlett Packard 8543 bylo proměřeno absolutní spektrum (250 – 650 nm) heminu, apo-cyt b_5 VZ1 a byly zjišťovány změny, ke kterým dochází po přidavcích heminu k apo-cyt b_5 VZ1. Do křemenné kyvety o optické dráze 1 cm bylo pipetou nanášeno 1,5 ml pufru TRIS/HCl (20 mM, pH 8,0) a proti tomuto slepému vzorku byla změřena absorbance 1,5 μ l heminu v 1,5 ml TRIS/HCl. Absorpční maximum heminu bylo určeno při vlnové délce 385 nm. Dále bylo změřeno spektrum 60 μ l apo-cyt b_5 v 1,5 ml TRIS/HCl. Absorpční maximum apo-cyt b_5 bylo určeno při vlnové délce 280 nm. K tomuto roztoku bylo přidáváno po 1,5 μ l heminu a po každém přidavku bylo proměřeno absolutní spektrum. Grafické znázornění spekter je ve výsledcích na **Obr. 11** na str. 33.

3.3.3 Titrace apoformy cytochromu b_5 metalo-protoporfyriny IX - diferenční spektra

Byly určovány koncentrace čtyř frakcí apo-cyt b_5 vypsanych v kapitole 3.1. Pro toto stanovení bylo místo absolutního měření spekter použito diferenční měření. Absolutní spektra jsou měřena proti stejnému slepému vzorku, kterým v našem případě byl pufr

TRIS/HCl. Diferenční spektra však vyjadřují rozdíl mezi aktuálním měřeným vzorkem a posledním měřeným vzorkem. V diferenčním spektru jsou potlačeny spektrální rysy společné pro dvě po sobě následujícími měření a jsou zvýrazněny změny, ke kterým dochází přidávkem další chemikálie (heminu). Je proto vhodné pro měření malých změn ve spektrech, a to nejen změn hodnot absorbance, ale i posunu spekter podél osy vlnových délek.

Nejprve bylo proměřeno spektrum 120 μl apo-cyt b_5 VZ1 v 1,5 ml TRIS/HCl s absorpčním maximem při vlnové délce 280 nm. K tomuto roztoku byl přidán 1 μl 1 mM heminu. Diferenční spektrum bylo proměřováno v intervalech 1 minuty do doby, kdy se přestalo měnit spektrum oblasti 250 - 650 nm. Tím byla určena doba pro vytvoření komplexu apo-cyt b_5 s heminem. Dále byl do kyvety přidáván, postupně po 0,5 μl , roztok heminu. Mezi každým přidávkem a změřením diferenčního spektra roztoku v kyvetě se čekalo na ustálení spektra. Ve chvíli, kdy vlnová délka absorpčního maxima začala klesat, ukončilo se měření v důsledku přetitrování roztoku (roztok obsahoval větší množství heminu než cytochromu b_5). Následně se určil bod ekvivalence, označující stav, kdy je k frakci apo-cyt b_5 VZ1 přidáno takové množství heminu, při kterém je vzorek právě ztitrován.

Tímto postupem byla získána spektra i dalších frakcí apo-cyt b_5 (VZ2 – VZ4). Z určených bodů ekvivalence byly vypočítány koncentrace frakcí apo-cyt b_5 (c_{titr}) podle níže uvedeného vztahu za předpokladu, že c_{titr} odpovídá koncentraci apoformy schopné vázat hem:

$$c_{\text{titr}} = \frac{c_{\text{hemin}} \cdot V_{\text{hemin}}}{V_{\text{apo}}}$$

c_{hemin} - koncentrace připraveného roztoku
 metalo-protoporfyrinu IX dle kapitoly 3.3.1
 – tj. 1 mM
 V_{hemin} - objem roztoku heminu přidávaného do kyvety
 V_{apo} - objem frakce apo-cyt b_5 přidávaného do kyvety

Pro stanovení stability proteinů pulzní proteolýzou byly připraveny rekonstituované frakce apo-cyt b_5 VZ3 s ligandem heminu (ion železa tvoří přirozenou součást cyt b_5 v buňkách jater) a rekonstituované frakce obsahující ionty kovů Mn^{3+} , Cr^{3+} nebo Co^{3+} , za využití 1 mM roztoků metalo-protoporfyrinů IX připravených dle kapitoly 3.3.1.

Pro přípravu roztoků byla nejprve proměřována diferenční spektra frakce apo-cyt b_5 VZ3 titrované metalo-protoporfyriny IX podobným postupem popsáním pro hemin.

Měření se však lišilo dobou potřebnou pro vytvoření komplexu VZ3 s daným metalo-protoporfyrinem IX a oblastí vlnových délek, jež byly sledovány. Z měření se opět určil objem roztoku metalo-protoporfyriu IX, při kterém je VZ3 natitrován. Roztoky natitrovaného apo-cyt b₅ (o objemu min. 70 µl) byly připraveny ve zkumavkách dle Eppendorfa přidáním odpovídajícího množství metalo-protoporfyriu IX (přepočítaného z objemu odpovídající natitrovanému VZ3 v kyvetě). Vzorky byly rozděleny pipetou do několika zkumavek dle Eppendorfa a uloženy při teplotě –80 °C.

3.3.4 Pulzní proteolýza

Pulzní proteolýza byla provedena metodou dle Parka a kol. [31]. Pro tuto metodu byly použity následující roztoky: apoforma králíčího solubilního cyt b₅ (VZ3), holoforma králíčího solubilního cyt b₅ (rekonstituovaný VZ3 s navázaným heminem nebo jeho analogy připravených dle kapitoly 3.3.3), 10 M močovina, 1 M CaCl₂, 50 mM EDTA/NaOH (pH = 8), 0,02% thermolysin (obsahující 2,5 M NaCl a 10 mM CaCl₂). Jako pufr, v němž byly všechny roztoky pro pulzní proteolýzu připravovány, byl použit 100 mM TRIS/HCl (pH = 7,4).

Nejprve byly připraveny 0,05% roztoky cyt b₅ (apo- i holoformy s navázaným heminem) o objemu 50 µl, koncentraci CaCl₂ 10 mM a koncentraci močoviny 0 M až 8 M (konkrétně 0, 2, 4, 6, 8 M). Tyto roztoky byly ponechány přes noc při laboratorní teplotě, aby došlo k ustanovení rovnováhy mezi sbaleným a rozbaleným proteinem [29].

Další den (po 16 h) byly roztoky inkubovány při teplotě 25 °C, otáček 400 rpm, po dobu 5 min. Do každého z těchto roztoků byl přidán 1 µl 0,02% thermolysinu. Reakce probíhala po dobu 1 min. Poté bylo 40 µl roztoku přeneseno do 13,3 µl 50 mM EDTA/NaOH předem připravených ve zkumavkách dle Eppendorfa (0,5 ml). Tímto byla zastavena enzymová reakce thermolysinu.

Další experimenty pak byly prováděny za upravených podmínek, které představovaly změnu doby preinkubace s močovinou (preinkubace probíhala 16 h, 2 h nebo 1 h), teploty preinkubace s močovinou (7 °C, 25 °C nebo 35 °C), nebo teploty, při které probíhala samotná pulzní proteolýza (25 °C nebo 35 °C). Objem vzorků připravovaných pro pulzní proteolýzu se snížil ze 40 µl na 15 µl a do tohoto objemu bylo přidáváno požadované množství EDTA/NaOH.

Pro pulzní proteolýzu byly připravovány kontrolní roztoky o objemu 15 μ l: 1. roztok obsahující 10 mM CaCl_2 , 4 M močovinu; 2. roztok (KH) obsahující 0,05% holoprotein (rekonstituovaný VZ3), 10 mM CaCl_2 , 4 M močovinu; 3. roztok (KA) obsahující 0,05% apoformu VZ3, 10 mM CaCl_2 , 4 M močovinu. Kontrolní vzorky byly inkubovány s močovinou i s thermolysinem za stejných podmínek jako ostatní vzorky. Do roztoků KH a KA bylo však před samotnou pulzní proteolýzou přidáno 5 μ l EDTA/NaOH.

Vzorky byly po pulzní proteolýze podrobeny SDS-PAGE a následně byla z elektroforeogramů vyhodnocena optická denzita zón přiřazených neštěpenému cyt b_5 za pomoci programu ImageJ.

Pro závěrečný experiment byly připraveny vzorky nejen apo- a holoformy cyt b_5 s ionty Fe^{3+} , ale i vzorky ostatních holoform obsahujících v prosthetické skupině ionty Mn^{3+} , Cr^{3+} a Co^{3+} . Nejprve byly připraveny 35 μ l roztoky o koncentraci proteinu 0,05%, koncentraci močoviny 4M a koncentraci CaCl_2 10mM. Z tohoto roztoku byly odebrány dvě stejné alikvoty o objemu 15 μ l a dány do zkumavek dle Eppendorfa. Pro každý hemoprotein či apoprotein byly tak dále připraveny 2 typy vzorků. U prvního typu vzorků (sloužících jako kontrola) bylo k 15 μ l roztoku před provedením pulzní proteolýzy přidáno 5 μ l EDTA/NaOH. U druhého typu vzorků bylo 5 μ l EDTA/NaOH přidáno až po minutové inkubaci s thermolysinem. Vzorky byly preinkubovány 1,25 h při teplotě 7 $^{\circ}\text{C}$ a poté byly vzorky na 10 min vloženy do inkubátoru na nastavenou teplotu 25 $^{\circ}\text{C}$. Do všech roztoků bylo přidáno 0,3 μ l thermolysinu. Pulzní proteolýza probíhala při 25 $^{\circ}\text{C}$ 1 min a byla ukončena přidáním 5 μ l 50 mM roztoku EDTA/NaOH.

Poté byla provedena SDS-PAGE (navíc byly udělány dvě kontrolní SDS-PAGE) a následně byly elektroforeogramy všech tří elektroforéz zpracovány v ImageJ. Byly tak získány relativní hodnoty intenzit zón obsahujících holoformu cyt b_5 (z každého vzorku tři hodnoty). Dále byly vypočteny poměry štěpeného a neštěpeného cyt b_5 . (tj. optická denzita zóny odpovídající vlastnímu vzorku holoformy s určitým metalo-protoporfyrinem IX byla dána do poměru s optickou denzitou zóny odpovídající kontrolnímu vzorku.)

3.3.5 Elektroforéza SDS-PAGE

Přestože je SDS-PAGE elektroforéza (z angl. „sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis”, tedy elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného) poměrně pracnou metodou, v posledních desetiletích se stala

velmi oblíbenou metodou pro srovnávání a charakterizaci bílkovin. Klasická elektroforéza (neboli kapilární elektroforéza) rozděluje bílkoviny na základě hodnoty jejich náboje. Při SDS-PAGE se na bílkovinu váže anionický detergent SDS v poměru 1 g SDS na 1,4 g bílkoviny. Skutečné náboje bílkovin se stávají zanedbatelnými v porovnání s negativním nábojem, který poskytuje navázaný SDS a bílkovina migruje v polyakrylamidovém gelu o vhodné porozitě podle své velikosti [32].

Při SDS-PAGE elektroforéze byly použity chemikálie následujícího složení:

- pufr A: 0,375 M TRIS/HCl; 0,1% SDS (w/v); pH 8,8
- pufr B: 0,125 M TRIS/HCl; 0,1% SDS (w/v); 0,0006% bromfenolová modř (w/v); pH 6,8
- polymerační roztok A: 30% akrylamid (w/v); 0,8% BIS (w/v) v pufru A
- polymerační roztok B: 30% akrylamid (w/v); 0,8% BIS (w/v) v pufru
- vzorkový pufr redukující (4x koncentrovaný): 0,25 M TRIS/HCl; 8% SDS (w/v); 40% glycerol (v/v); 20% 2-merkaptoethanol (v/v); 0,012% bromfenolová modř (w/v); pH 6,8
- elektrodový pufr: 0,025 M TRIS/HCl; 0,192 M glycín; 0,1% SDS (w/v); pH 8,3
- fixační roztok: 10% isopropanol (v/v); 10% kyselina octová (v/v)
- barvicí lázeň: 0,25% Coomassie Blue R-250 (w/v); 46% ethanol (v/v); 9,2% kyselina octová (v/v)
- odbarvovací lázeň: 25% ethanol (v/v); 10% kyselina octová (v/v)

Skla určená pro elektroforézu byla umyta prostředkem na mytí nádobí a ethanollem. Po uschnutí byla skla vložena do stojanu pro přípravu gelů a upevněna šrouby.

Mezi skla byl pipetován 15% (w/v) spodní (separační) gel připravený v kádince smícháním chemikálií v následujícím pořadí: 3,5 ml pufru A, 3,5 ml polymeračního roztoku A, 7 μ l TEMED a 70 μ l 10% persíranu amonného. Gel dosahoval výšky asi 6 cm a byl převrstven destilovanou vodou. Polymerace probíhala přibližně 45 min. Po zpolymerování gelu byla destilovaná voda vylita a povrch gelu byl vysušen filtračním papírem. Na separační gel byl nanesen 4% (w/v) vrchní (zaostřovací) gel připravený v kádince z chemikálií v následujícím pořadí: 2,6 ml pufru B, 400 μ l polymeračního roztoku B, 3 μ l TEMED a 60 μ l 10% persíranu amonného. Do vrchního gelu byl vložen hřeben tvořící šablonu pro jamky, do kterých se později nanáší vzorek. Po ztuhnutí

vrchního gelu (zhruba 45 min) byl vyjmut hřeben a do stojanu byl nalit elektrodový pufr tak, aby vyplňoval i jamky.

Do jamek byl Hamiltonovou stříkačkou nanesen vzorek o objemu daném velikostí jamek vytvořených různě hustými hřebeny. Hustší hřeben vytvoří 15 jamek, do kterých se vejde maximálně 12 μl vzorku na 1 jamku, řidší vytvoří 10 jamek, do kterých se vejde maximálně kolem 25 μl vzorku na 1 jamku. Mezi jednotlivými přídávky vzorku do jamek byla Hamiltonova stříkačka alespoň 2x promyta destilovanou vodou, aby nedošlo ke kontaminaci jinými vzorky.

Vzorek byl připravený následovně: Určité množství roztoku (připraveného dle kapitoly 3.3.4) bylo ve zkumavkách dle Eppendorfa zředěno odpovídajícím množstvím 4x koncentrovaného vzorkového pufru (tedy 1 díl 4x koncentrovaného vzorkového pufru bylo smícháno s 3 díly vzorku) nebo 2x koncentrovaného vzorkového pufru (ředění 1:1). Vzorek byl 5 min povařen v horké vodní lázni a odstředěn na stolní centrifuze.

Dolní silikonové těsnění stojanu bylo uvolněno a stojan byl vložen do elektroforetické vany. Následně byla vana uzavřena víkem a spojena se zdrojem pro elektroforézu. Elektroforéza probíhala ve vertikálním uspořádání při napětí 80 V, které bylo po 30 min zvýšeno na 150 V. Elektroforéza byla ukončena v okamžiku, kdy čelo tvořené bromfenolovou modří dosáhlo asi 1 cm nad dolní okraj skel.

Poté byla skla vyndána z elektroforetické aparatury a opatrně od sebe oddělena. Zaostrovací gel byl odstraněn a separační gel byl vložen alespoň na 1 hodinu do barvicí lázně. Následně byl gel přes noc odbarven v odbarvovací lázni.

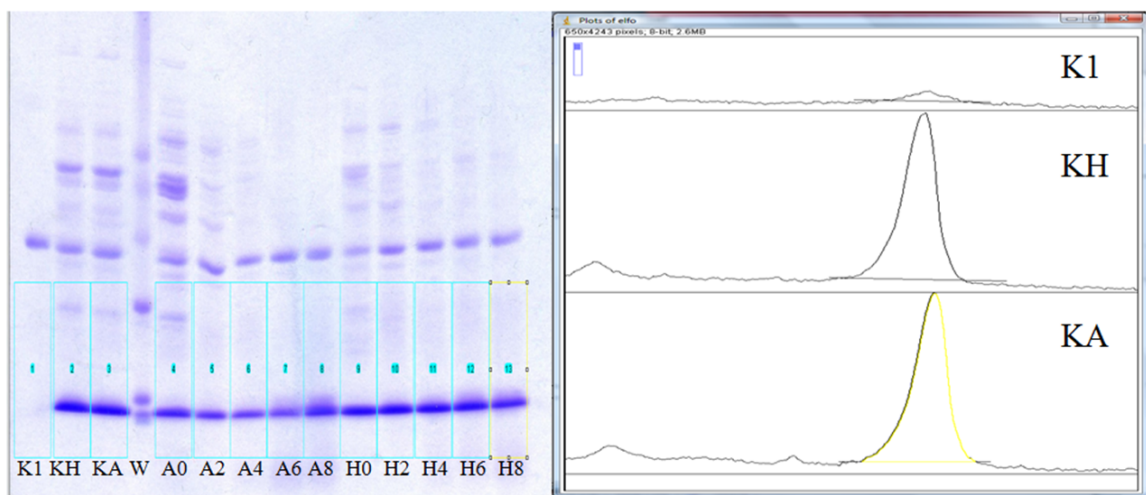
3.3.6 Kvantifikace proteinu v gelu

Po digitalizaci elektroforeogramu na scanneru (HP ScanJet 4370) byla optická denzita jednotlivých zón odpovídajících neštěpenému cyt b₅ srovnávána s využitím programu ImageJ [33].

Přes program ImageJ byl načten skenovaný obrázek, který měl být vyhodnocen. Na obrázku byly vybrány sloupce zahrnující zóny cyt b₅ v jednotlivých dráhách. Tento sloupec byl aplikován i na ostatní dráhy rozděleného vzorku s cyt b₅, přičemž plocha sloupců zůstala zachovaná. Poté byla programem graficky znázorněna optická denzita zón. Ručně se vybrala plocha pro integraci a následně se zobrazily relativní hodnoty intenzit

analyzovaných zón náležících neštěpenému cyt b₅. Tato data byla vynesena do grafu pomocí programu Microsoft Excel.

Obr. 10 ukazuje příklad vyhodnocování optické denzity jednotlivých zón příslušejících cyt b₅ na elektroforeogramu po pulzní proteolýze pomocí programu ImageJ.



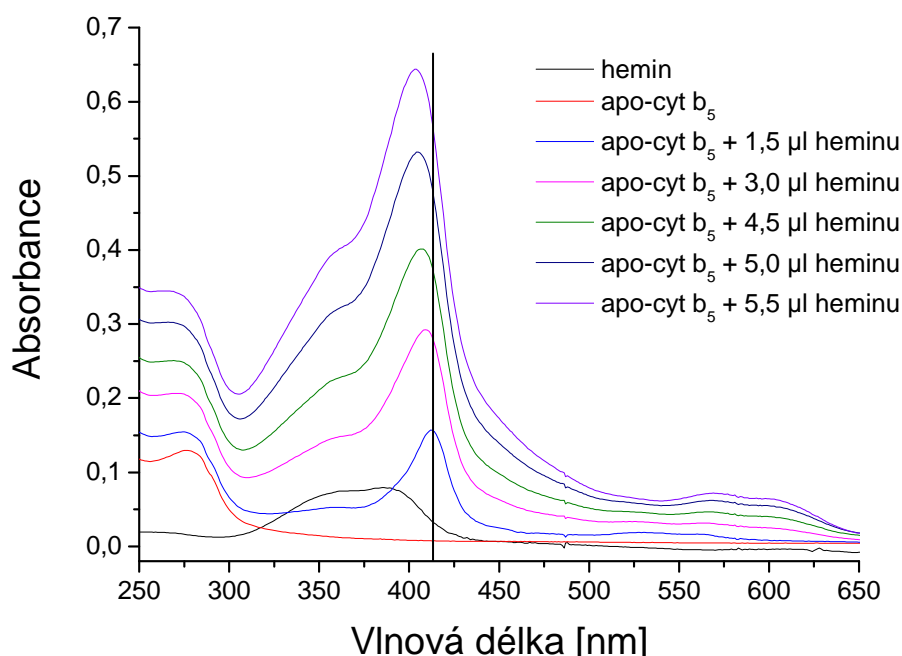
Obr. 10: Vyhodnocení elektroforeogramu v ImageJ. Obrázek vlevo představuje elektroforeogram vzorků po pulzní proteolýze a na něm vyznačené sledované zóny intenzit pomocí programu ImageJ. Vpravo je ukázka grafického vyhodnocení zón s využitím ImageJ. Integrovaná plocha jednoho ze vzorků (konkrétně KA) je ohraničena žlutě. Z těchto grafů lze získat relativní hodnoty intenzit zón odpovídající relativnímu zastoupení neštěpeného proteinu. (K1, KH a KA představují kontrolní vzorky, A značí apoprotein, H – holoprotein; číslo u písmene A nebo H vyjadřuje molární koncentraci močoviny, při které byla provedena pulzní proteolýza. WR značí standard pro elektroforézu od firmy Sigma (Sigma Marker))

4. Výsledky

4.1 Rekonstituce apo-cyt b_5 s metalo-protoporfyriny IX

4.1.1 Titrace apoformy cytochromu b_5 heminem - absolutní spektra

Absolutní spektrum heminu (znázorněné na **Obr. 11** černě) a apo-cyt b_5 (červeně) se výrazně liší. Zaměříme-li se na vlnové délky, při kterých tyto látky vykazují nejvyšší absorbanci, vyčteme, že absorbance heminu dosahuje maxima při vlnové délce 385 nm a absorpční maximum apo-cyt b_5 je při 280 nm. Přidáváním heminu k apo-cyt b_5 se zvyšuje absorbance nejen při výše uvedených vlnových délkách, ale zejména i při vlnové délce 412 nm. Tato vlnová délka vypovídá o vzniku komplexu apo-cyt b_5 s heminem [17]. Dojde-li k přetitrování roztoku heminem, je spektrum ovlivněno jeho nadbytkem a maximum se pomalu posouvá směrem k absorpčnímu maximu heminu 385 nm. Absolutní spektra jsou zobrazena na **Obr. 11**.

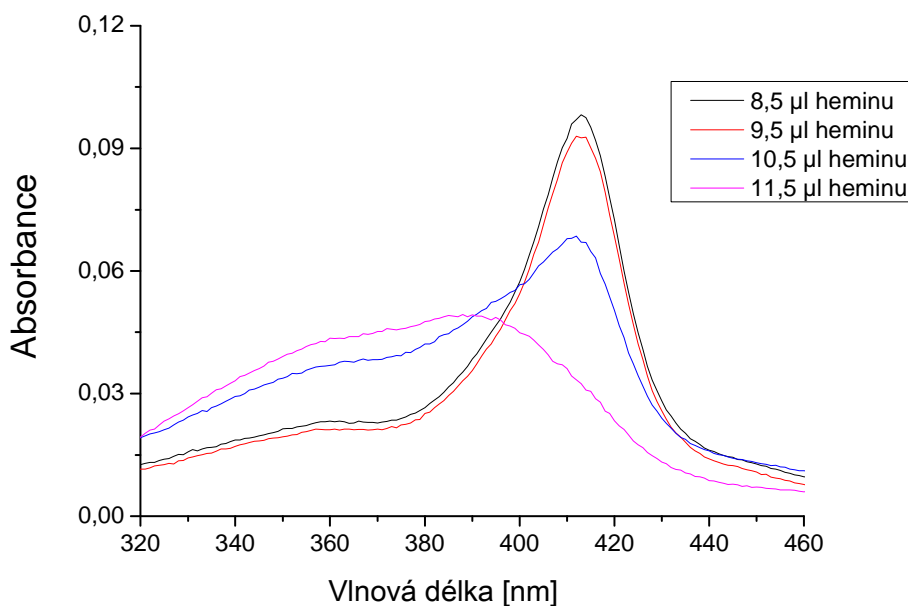


Obr. 11: Inkorporace heminu do apo-cyt b_5 VZ1: Spektrum heminu má na obrázku černou barvu, apo-cyt b_5 červenou. Další jednotlivá absorpční spektra vykazují nárůst hodnoty absorbance po přidavku 1,5 μ l 1 mM heminu. Na obrázku je zvýrazněná vlnová délka 412 nm odpovídající absorpčnímu maximu holoforby cyt b_5 .

Nevýhodou tohoto postupu však je, že ke znatelnému posunu maxima spektra dochází až při větším nadbytku metalo-protoporfyrinu IX, a to v závislosti na povaze jeho spektra. Proto bylo dále využito diferenčních spekter, která reagují na změnu ve spektrech mnohem citlivěji.

4.1.2 Určování koncentrace cytochromu b_5 z diferenčních spekter

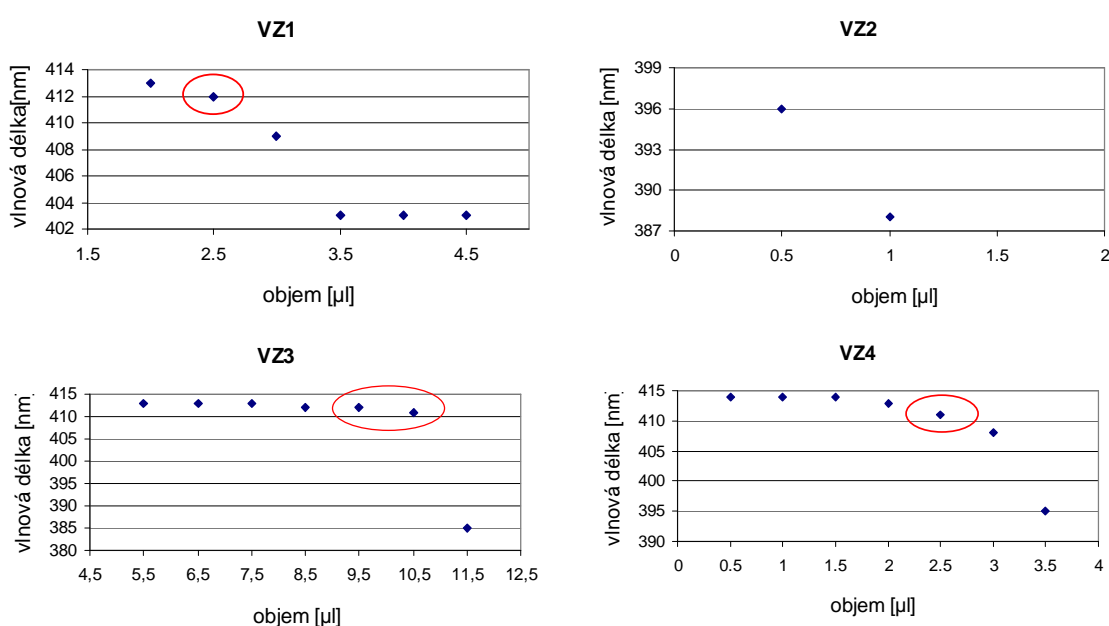
Přidáváním heminu k apo-cyt b_5 se v diferenčním spektru nejprve objevuje absorpční maximum při vlnové délce 412 nm, tj. absorpční maximum odpovídající komplexu apo-cyt b_5 s heminem. Po určitém přidaném množství heminu se absorpční maximum spektra posouvá k nižším vlnovým délkám. Jelikož se hemin váže na apo-cyt b_5 v poměru 1:1, toto posunutí naznačuje vyšší molární zastoupení heminu než cyt b_5 . Diferenční měření jedné ze čtyř frakcí je na **Obr. 12**.



Obr. 12: Titrace apo-cyt b_5 VZ3 heminem. Grafy ukazují část diferenčního měření během titrace, kdy došlo k přechodu mezi vznikající holoformou (černé a červené spektrum) a přebytkem heminu (modré a růžové). Diferenční spektra byla měřena v pořadí černá, červená, modrá, růžová a představují změny diferenčního měření po přidavcích 8,5; 9,5; 10,5 a 11,5 µl heminu.

Vlastní frakce apo-cyt b_5 VZ3 obsahovala jen stopové množství holoformy, které bylo na základě absorbance frakce při 412 nm odhadnuto na 0,1 %. Vliv takto malého množství holoformy ve frakci je pak dále zanedbáván.

Grafy na **Obr. 13** představují závislost posunu absorpčního maxima cyt b_5 během měření diferenčních spekter během titrace 4 frakcí apo-cyt b_5 heminem. Na grafech jsou vyznačeny body ekvivalence titrace. U VZ2 nebyl určen žádný bod ekvivalence. Tento vzorek neobsahoval protein schopný vázat hemin. Ve spektru se 120 μ l VZ2 se objevily charakteristické rysy apoproteinu; v dalším měření spektra se po přidání 0,5 μ l heminu očekával vznik absorpčního maxima při 412 nm, ale k takovému jevu nedošlo.



Obr. 13: Závislosti posunu vlnové délky absorpčního maxima na množství přidaného heminu k apo-cyt b_5 . Hodnoty byly získány měřením diferenčních spekter během titrace heminem. Červeně označené body vyjadřují bod ekvivalence. VZ2 nevykazoval charakteristické rysy holoformy cyt b_5 , proto nebyl určen bod ekvivalence.

Z bodů ekvivalence byly z rovnice popsané v kapitole 3.3.3 vypočteny koncentrace frakcí apo-cyt b_5 určených dle titrace a dány do tabulky (**Tab. 1**) společně s hodnotami koncentrací určených pomocí BCA s využitím BSA jako standardu, hodnoty v mg/ml poskytnuté RNDr. Věrou Černou, Ph.D byly přepočteny na molární koncentrace.

Tab. 1: Přehled frakcí apo-cyt b₅ a jejich koncentrací. Tabulka udává, zda se jednalo o solubilní či membránovou formu apo-cyt b₅ ve frakcích a celkový objem frakcí, který byl k dispozici pro další experimenty. Dále jsou uvedeny molární koncentrace frakcí určené pomocí BCA s využitím BSA jako standardu (c_{BCA}) a dle titrace (c_{titr})

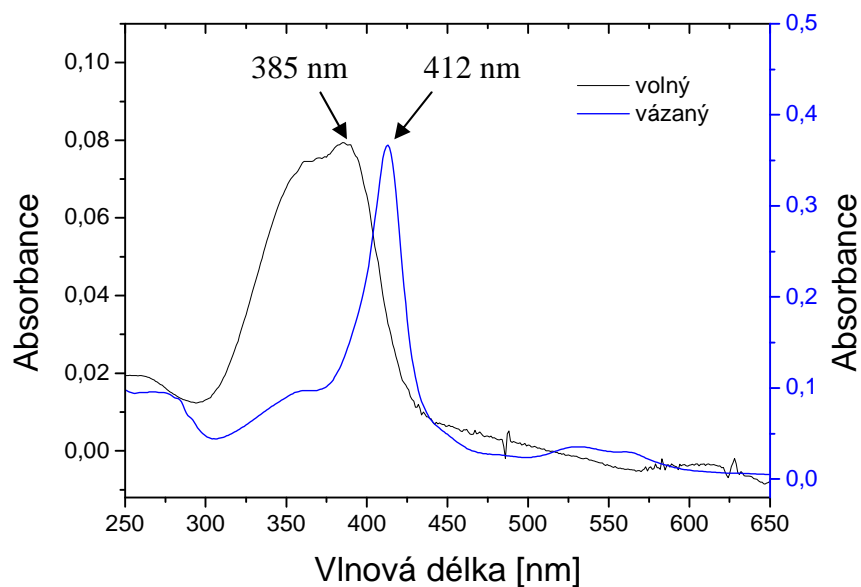
	VZ1	VZ2	VZ3	VZ4
forma cyt b ₅	membránová	membránová	solubilní	membránová
množství preparátu [ml]	5,6	~ 1,5	1	1,8
c_{BCA} [μM]	130	nestanoveno	nestanoveno	120
c_{titr} [μM]	21	0	1300 – 1400	63

K přepočtu z hmotnostní koncentrace na molární koncentraci bylo využito údajů molárních hmotností králíčího cyt b₅: 15 218 g/mol pro membránovou formu a 10 450 g/mol pro solubilní formu (v těchto hmotnostech není započítán hem a počáteční aminokyselina - methionin). Z porovnání koncentrací zjištěných pomocí BCA a titrace je patrné, že se tyto hodnoty koncentrací podstatně liší. K dalším experimentům byla využita frakce apo-cyt b₅ VZ3, která vykazovala nejvyšší koncentraci apoformy schopné vázat hemin.

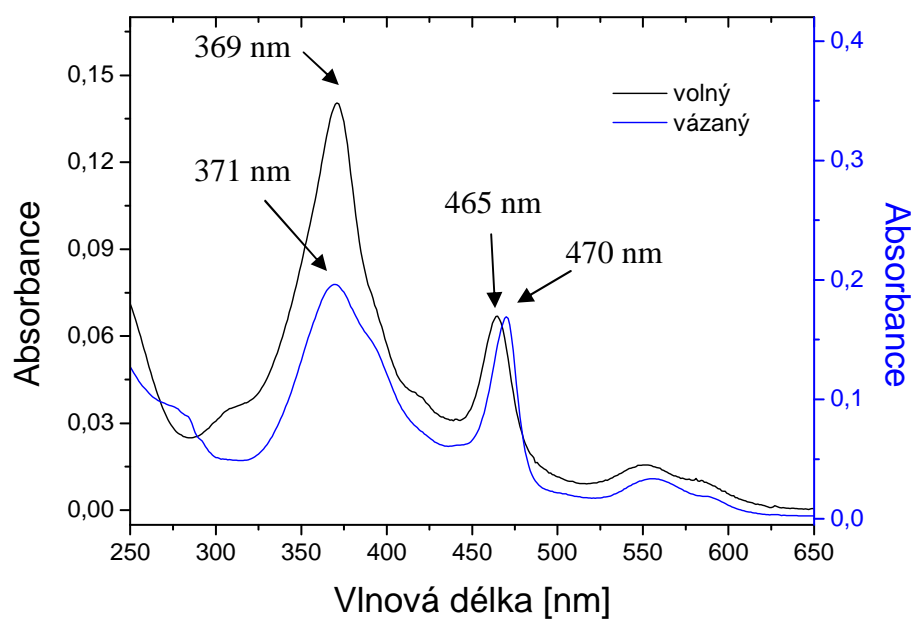
4.1.3 Spektra metalo-protoporfyrinů IX volných v roztoku a vázaných na apoformu cyt b₅

Frakce apo-cyt b VZ3 (dále pouze apo-cyt b₅) byla titrována metalo-protoporfyriny IX obsahující Fe^{III}, Co^{III}, Mn^{III} nebo Cr^{III}.

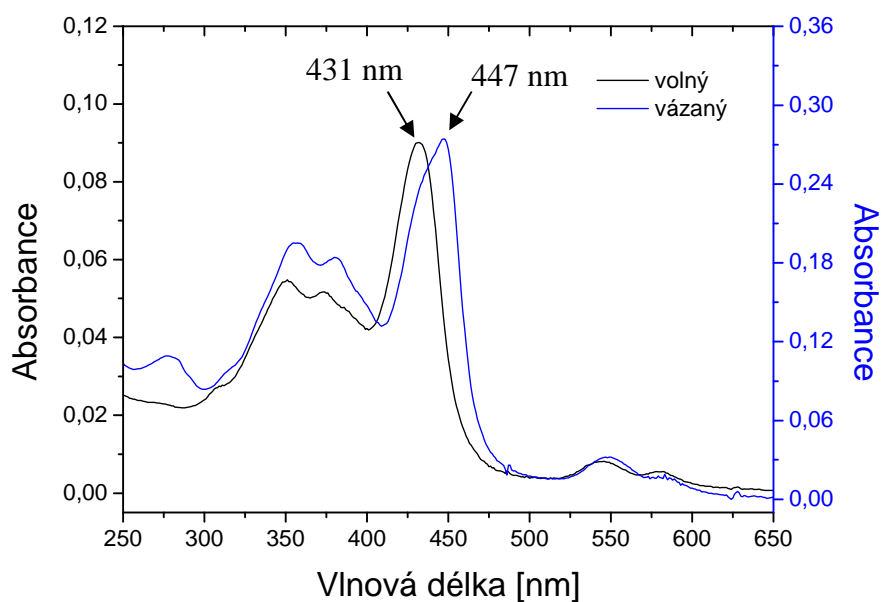
Následující obrázky (Obr. 14 - 17) jsou ukázkou, jak vypadají spektra volných metalo-protoporfyrinů IX v TRIS/HCl ve srovnání s metalo-protoporfyriny IX vázaných na apo-cyt b₅ (měřeno v TRIS/HCl). Na obrázcích jsou znázorněny vlnové délky absorpčních maxim spekter. Hodnota absorbance závisí na koncentraci měřené látky v kyvetě – ta byla v jednotlivých měření různá a neměla zásadní význam pro vyhodnocování.



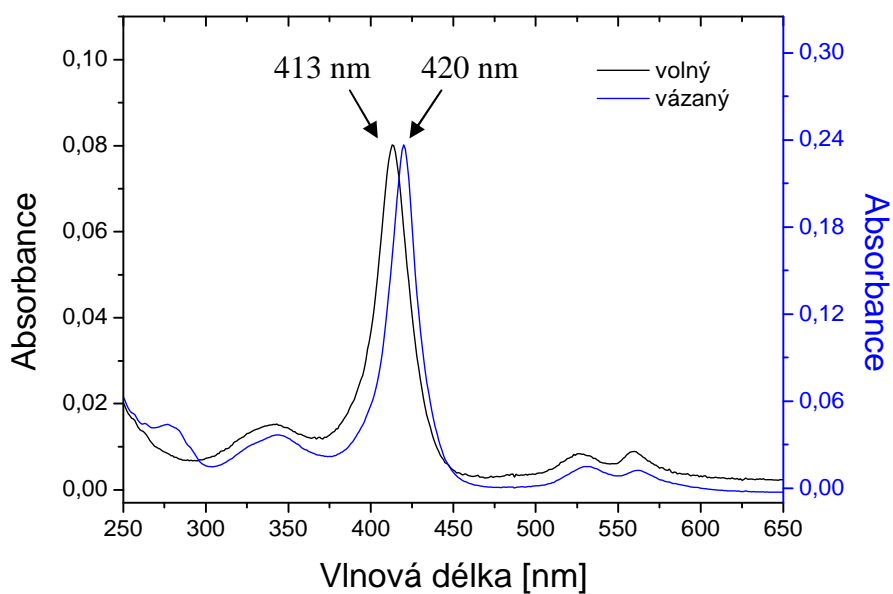
Obr. 14: UV-vis spektrum heminu – volný v roztoku TRIS/HCl pH 8 (černě), vázaný apo-cyt b₅ v roztoku TRIS/HCl pH 8 na (červeně).



Obr. 15: UV-vis spektrum Mn^{III} protoporphyrinu IX – volný v roztoku TRIS/HCl pH 8 (černě), vázaný na apo-cyt b₅ v roztoku TRIS/HCl pH 8 (červeně).



Obr. 16: UV-vis spektrum Cr^{III} protoporfyrinu IX – volný v roztoku TRIS/HCl pH 8 (černě), vázaný na apo-cyt b₅ v roztoku TRIS/HCl pH 8 (červeně).



Obr. 17: UV-vis spektrum Co^{III} protoporfyrinu IX – volný v roztoku TRIS/HCl pH 8 (černě), vázaný na apo-cyt b₅ v roztoku TRIS/HCl pH 8 (červeně).

4.1.4 Orientační porovnání rychlostí inkorporace protoporfyrinů IX do apoformy cyt b₅

Při titraci apo-cyt b₅ metalo-protoporfyriny IX a proměřování jejich spekter se ukázalo, že vytvoření komplexu mezi těmito sloučeninami nemusí probíhat stejně rychle jako u heminu. Pro protoporfyriny IX obsahující Co^{III} a Mn^{III} je čas potřebný pro vytvoření komplexu víceméně podobný, ale pro Cr^{III} protoporfyrin IX bylo zapotřebí mnohem delšího časového úseku. Časy potřebné pro vytvoření komplexů jsou uvedeny v **Tab. 2**. Společně s těmito údaji jsou do tabulky zahrnuta množství metalo-protoporfyrinů IX, která byla potřeba přidat k 7,5 µl apo-cyt b₅ (zjišťováno spektrofotometricky v kyvetě), aby vzniklo maximální množství holoformy. Na základě těchto údajů byly vytvořeny titrované vzorky o větším objemu (211 µl vzorku pro komplex s vázaným heminem a ~70 µl vzorku pro komplexy cyt b₅ s navázanými metalo-protoporfyriny IX obsahující Mn^{III}, Cr^{III} nebo Co^{III})

Tab. 2: Srovnání titrace apo-cyt b₅ pro různé metalo-protoporfyriny IX. V tabulce jsou vypsány komplexy, které byly tvořeny, čas potřebný pro vytvoření komplexu během jednoho diferenčního měření a spotřebované množství metalo-protoporfyrinů IX na 7,5 µl apo-cyt b₅.

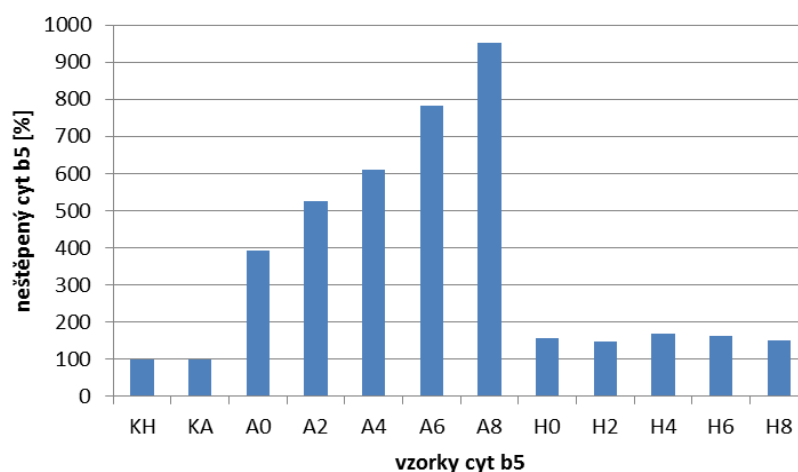
Komplex	Čas [min]	Spotřeba metalo-protoporfyrinu IX [µl] na 7,5 µl apo-cyt b ₅ [µl]
Apo-cyt b ₅ s prosthetickou skupinou heminu	7	9,5-10,5
Apo-cyt b ₅ s Mn ^{III} protoporfyrin IX chloridem	5	10
Apo-cyt b ₅ s Cr ^{III} protoporfyrin IX chloridem	~ 60	11,25
Apo-cyt b ₅ s Co ^{III} protoporfyrin IX chloridem	10	10

4.2 Vliv prosthetické skupiny na konformační stabilitu cytochromu b₅

4.2.1 Určení C_m apo- a holoformy cytochromu b₅ pomocí pulzní proteolýzy

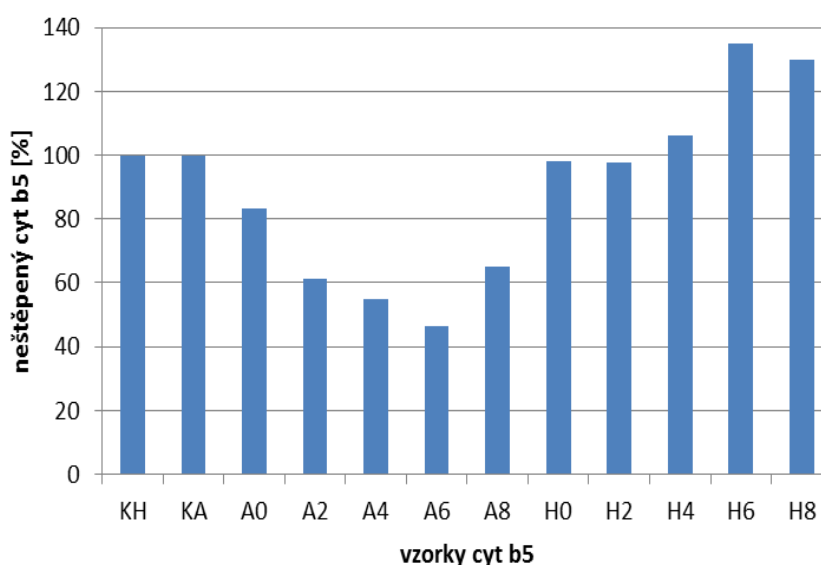
Byl učiněn pokus o použití metody pulzní proteolýzy k určení koncentrace denaturačního činidla v inflexním bodě (C_m; anlg. „midpoint of the urea-induced unfolding transition“) pro apo- a holoformu solubilního králíčího cyt b₅ (viz kapitola 1.5.1).

Nejprve byly ověřovány podmínky experimentu, tak jak jsou popsány v literatuře [29,31]. Ukázalo se však, že použitý preparát holoformy cyt b₅ není za těchto podmínek stabilní a pravděpodobně dochází k jeho degradaci během inkubace s močovinou (**Obr. 18**). Jak je z obrázku patrné, došlo k degradaci kontroly obsahující cyt b₅, zatímco vzorky cyt b₅ inkubované při vyšší koncentraci močoviny byly degradovány méně. Štěpení apo-cyt b₅ thermolysinem bylo při teplotě 25 °C nedostatečné, a to i při vysokých koncentracích močoviny. Graf paradoxně vykazoval zdánlivou stabilizaci apo-cyt b₅ močovinou.



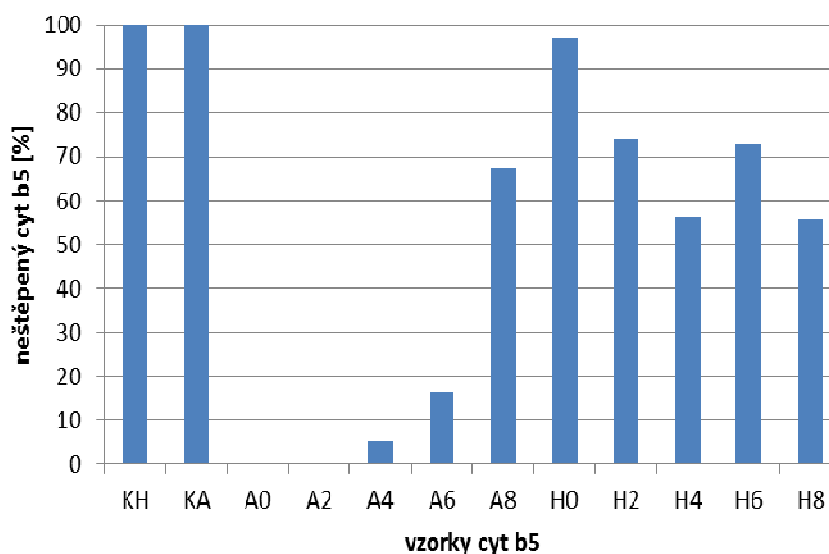
Obr. 18: Vyhodnocení pulzní proteolýzy provedené metodou dle Parka a kol. Vzorky cyt b₅ byly preinkubovány s močovinou 16 hodin při 25 °C. Reakce s thermolysinem probíhala 1 min při 25 °C. KA a KH představují kontrolní vzorky, A značí apoprotein, H – holoprotein; číslo u písmene A nebo H vyjadřuje koncentraci močoviny, při které byla provedena pulzní proteolýza. Jelikož EDTA pozastavuje reakci thermolysinu, byly kontrolní vzorky brány jako roztoky, u nichž se nachází 100 % neštěpeného proteinu.

Byly tedy hledány jiné podmínky vhodné pro určení C_m solubilního králíčího cyt b_5 . Konkrétně byla snížena teplota během 16 h preinkubace proteinu s močovinou na 7 °C a zároveň byla zvýšena teplota během inkubace s thermolysinem na 35 °C (**Obr. 19**). Na obrázku je již vidět očekávaný pokles neštěpeného proteinu s nárůstem koncentrace močoviny v případě apo-cyt b_5 . Holoforma však za daných podmínek znatelně štěpena není.



Obr. 19: Vyhodnocení pulzní proteolýzy, před níž byly vzorky inkubovány s močovinou 16 h při 7 °C, reakce s thermolysinem probíhala 1 min při 35 °C. Apoforma z počátku vykazuje očekávaný pokles zastoupení neštěpeného proteinu. Holoforma zůstává z větší části neštěpena.

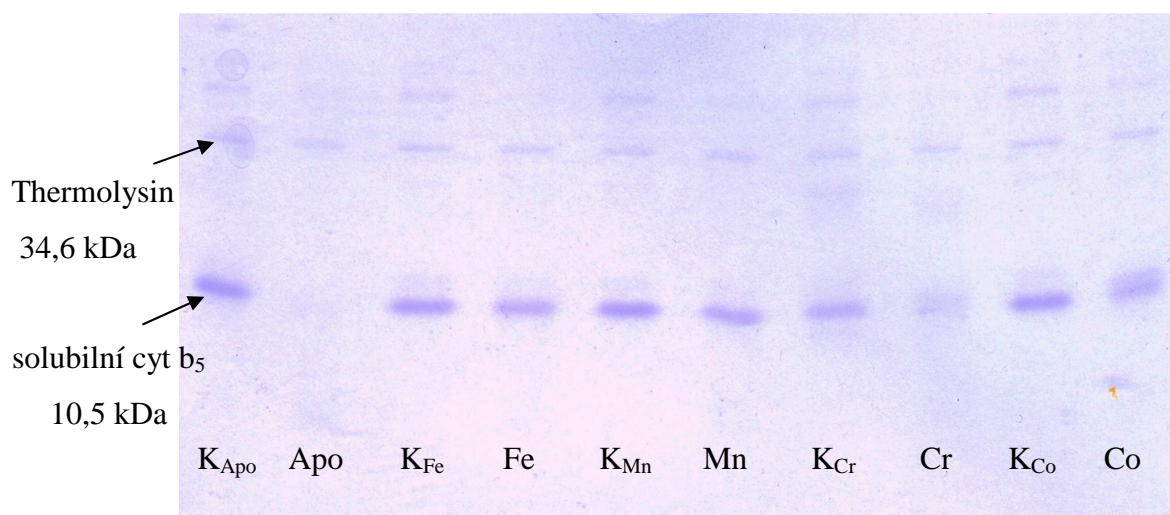
Existovala možnost, že i při preinkubaci za snížené teploty stále docházelo k nežádoucí degradaci cyt b_5 . Proto byla doba preinkubace proteinu s močovinou v následných experimentech ještě výrazně zkrácena (na 1 h), avšak bez výrazného vlivu na výsledek (data zde nejsou uvedeny). Ve snaze nalézt podmínky, při nichž by byla výrazně štěpena také holoforma cyt b_5 , byla prodloužena doba reakce s thermolysinem na 1,5 min (**Obr. 20**). Za tuto dobu byla holoforma částečně rozštěpena, ale tyto podmínky opět nebyly vhodné pro určení C_m apoformy, jelikož apoforma byla zcela degradována již při nulové koncentraci močoviny.



Obr. 20: Vyhodnocení pulzní proteolýzy, před níž byly vzorky inkubovány s močovinou 12 h při 7 °C, reakce s thermolysinem probíhala 1,5 min při 30 °C.

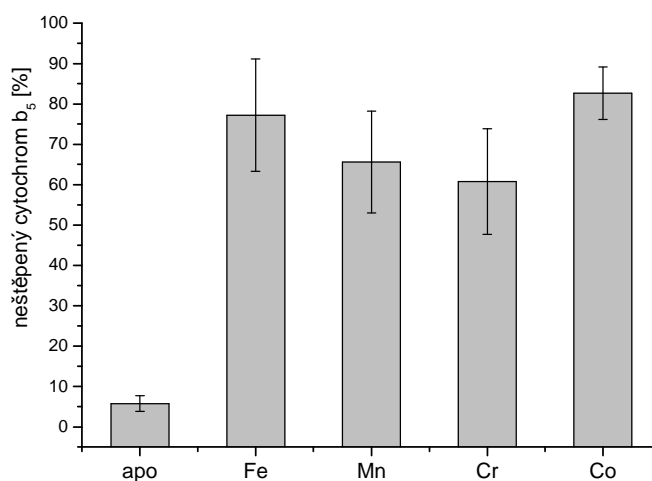
4.2.2 Porovnání vlivu prosthetické skupiny na konformační stabilitu cytochromu b₅

Stabilita cyt b₅ s různými prosthetickými skupinami (obsahující ionty Fe³⁺, Mn³⁺, Co³⁺ nebo Cr³⁺) byla porovnávána v roztocích s koncentrací močoviny 4 M, kdy je rozdíl mezi apoformou a holoformou dobře patrný. Pro každý holoprotein či apoprotein byly připraveny 2 typy vzorků lišících se od sebe pouze pořadím přidávání chemikálií. U kontrolních vzorků (K_{apo}, K_{Fe} ...) byla EDTA/NaOH přidána před provedením pulzní proteolýzy a nedocházelo tak ke štěpení proteinu vlivem thermolysinu. U vlastních vzorků (Apo, Fe ...) byla EDTA/NaOH přidána ke vzorku po minutové inkubaci s thermolysinem. Množství zbytkového neštěpeného proteinu bylo kvantifikováno pomocí SDS-PAGE, měření bylo provedeno 3x. Jeden z výsledných elektroforeogramů je na **Obr. 21**.



Obr. 21: Elektroforeogram pro porovnání apoformy a jednotlivých holoform cyt b_5 . K_{Apo} , K_{Fe} , K_{Mn} , K_{Cr} , K_{Co} značí vzorky, u kterých nedocházelo ke štěpení; Apo, Fe, Mn, Cr, Co označují thermolysinem štěpené vzorky. Již u tohoto elektroforeogramu je vidět, že apo-cyt b_5 je silně štěpen, zatímco ostatní vzorky podlely proteolýze méně mnohem.

Po digitalizaci byla porovnána zbytková množství proteinu ve vlastních vzorcích vůči kontrolním vzorkům a získané hodnoty, které jsou průměrem z celkem tří měření, byly vyneseny do grafu na **Obr. 22**.



Obr. 22: Porovnání stability jednotlivých testovaných forem cyt b_5 znázorněné jako zbytek neštěpeného cyt b_5 po pulzní proteolýze. Na grafu je znázorněna směrodatná odchylka vyjadřující rozptyl z celkem tří měření.

Z těchto výsledků je patrné, že cyt b₅ obsahující analogy hemu (s Mn^{III}, Cr^{III}, Co^{III}) vykazují výrazně vyšší odolnost vůči proteolýze než apoforma. Všechny také vykazují stabilitu srovnatelnou s holoformou cyt b₅ obsahující Fe^{III}. Poněkud nižší hodnota stability derivátu s Mn^{III} protoporfyrinem IX je v souladu s faktem, že Mn^{III} protoporfyrin IX má sníženou afinitu k apoformě cyt b₅ (K_d ~ 15 nM) projevující se přítomností zanedbatelného podílu apoformy v roztoku za podmínek inkubace [34]. Vlastní hodnoty výsledků z grafu na Obr. 22 jsou prezentovány v níže uvedené tabulce – **Tab. 3**.

Tab. 3: Průměrné zbytky neštěpeného cyt b₅. Čím jsou hodnoty nižší tím je apo- či holoprotein méně stabilní.

vzorek	Procenta zbytkového (neštěpeného) cyt b ₅
apoforma cytochromu b ₅	6 ± 2
cytochrom b ₅ s prosthetickou skupinou heminu	77 ± 14
cytochrom b ₅ s Mn ^{III} protoporfyrin IX chloridem	66 ± 13
cytochrom b ₅ s Cr ^{III} protoporfyrin IX chloridem	61 ± 13
cytochrom b ₅ s Co ^{III} protoporfyrin IX chloridem	83 ± 6

5. Diskuse

MFO systém má významnou roli v metabolismu cizorodých látek. Jeden z jeho členů cyt b_5 hraje důležitou roli v modulaci funkce MFO systému a tedy i v metabolismu cizorodých látek. Pro pochopení jakými mechanismy ovlivňuje cyt b_5 další enzymy tohoto systému je důležité mj. i studium struktury a konformační stability proteinu. Díky tomuto studiu se zjišťuje, jakým způsobem dochází k finální konformaci proteinů. Studium stability proteinů je také všeobecně využitelné pro porozumění příčin některých onemocnění či k vytvoření nových proteinů s požadovanými vlastnostmi „de novo“ [35].

K dispozici byly 4 frakce apo-cyt b_5 , které byly spektroskopicky charakterizovány pomocí titrace heminem. U frakcí apo-cyt b_5 VZ1 a VZ4 byly titrací určené koncentrace podstatně nižší než koncentrace určené dle stanovení pomocí BCA s využitím BSA jako standardem. Je tedy možné, že frakce obsahovaly podstatné množství proteinů nevázájících hem (např. denaturovaný apo-cyt b_5 či jiné proteiny). Je také možné, že metoda stanovení proteinů pomocí BCA s albuminem jako standardem trpí systematickou chybou přeceňující koncentraci apo-cyt b_5 např. v důsledku rozdílného aminokyselinového složení obou proteinů či přítomnosti zbytkových detergentů. Apo-cyt b_5 obsažený ve frakci VZ2 nevázal hemin vůbec. Jako nejvhodnější byla zvolena frakce apo-cyt b_5 VZ3. Ten zároveň vykazoval nejvyšší koncentraci apoformy vázající hemin a byl k dispozici v množství dostatečném pro další experimenty.

Kromě roztoku heminu byly také připraveny roztoky jeho analogů (protoporfyrinů IX obsahujících Mn^{III} , Co^{III} a Cr^{III}). Hemin se obvykle rozpouští obtížně, tak tomu bylo i v tomto případě, a navíc se obtížně rozpouštěl i Mn^{III} protoporfyrin IX. Je ale zajímavé, že v případě Co^{III} a Cr^{III} protoporfyrinů IX byla rychlost i úplnost rozpouštění kupodivu dobrá.

Pro přípravu nativní holoformy a jednotlivých derivátů cyt b_5 obsahujících metaloprotoporfyrin IX s Mn^{III} , Co^{III} nebo Cr^{III} byla využita titrace sledovaná pomocí diferenční spektroskopie, která se ukázala jako poměrně vhodná a i pro kvantitativní stanovení koncentrace apo-cyt b_5 . Byly popsány rozdíly v pozicích absorpčních maxim mezi volnými metaloprotoporfyriny IX a metaloprotoporfyriny IX vázaných na apo-cyt b_5 . Tyto rozdíly (5 - 27 nm) byly dostatečně velké pro sledování průběhu titrací.

U heminu je známo, že se váže na apo-cyt b_5 v poměru 1:1. Spotřeba metalo-protoporfyrinů IX obsahujících Mn^{III} , Co^{III} a Cr^{III} při titraci apo-cyt b_5 se příliš nelišila od spotřeby heminu. Lze tedy předpokládat, že se i analogy heminu váží na aktivní místo v molekule.

Rychlost inkorporace většiny derivátů do molekuly apo-cyt b_5 byla podobná jako u heminu. Cr^{III} protoporfyrin IX se však výrazně odlišoval - jeho komplex s apo-cyt b_5 se tvořil až 1 hodinu. To mohlo být způsobeno například jeho vyšší afinitou k pufru TRIS/HCl oproti ostatním metalo-protoporfyrinům IX.

Pulzní proteolýza není v laboratoři, kde tato práce vznikla, využívána a jedním z cílů této bakalářské práce bylo právě ověření potenciálu pulzní proteolýzy při studiu vlivu analogů hemu na strukturu a konformační stabilitu cyt b_5 . Pro optimalizování této metody v laboratoři se sice nepracovalo s hrubým buněčným lyzátem, což představuje hlavní výhodu této metody, ale zato díky vyhodnocení SDS-PAGE bylo ke stanovení stability potřeba malé množství proteinu. Bylo provedeno několik experimentů pulzní proteolýzy za podmínek uváděných v literatuře i pozměňovaných. Při provedení experimentu dle originální metodiky (preinkubace při laboratorní teplotě přes noc), docházelo k degradaci vzorku; metoda proto byla dále optimalizována. Nepodařilo se však nalézt takové podmínky, kdy by šlo současně stanovit C_m jak pro apo-cyt b_5 tak i pro holoformu rekonstituovanou s heminem či s jeho deriváty. Hlavním důvodem je především vysoká odolnost holoformy vůči denaturaci močovinou, která je možná srovnatelná či ještě vyšší než odolnost thermolysinu. Hodnota C_m pro holoformu cyt b_5 je pravděpodobně ještě podstatně vyšší než pro hemoglobin (ta byla stanovena na 6,4 M [29] a je již na horní hranici využitelnosti metody dané rozpustností močoviny ve vodě).

K porovnání stability proteinů byl proto proveden experiment, ve kterém vzorky s různě rekonstituovaným apo-cyt b_5 (obsahující Fe^{III} , Mn^{III} , Co^{III} a Cr^{III}) byly preinkubovány při jedné koncentraci močoviny (4 M) a následně vystaveny působení thermolysinu. Ukázalo se, že protoporfyriny IX obsahující Mn^{III} , Co^{III} a Cr^{III} stabilizují cyt b_5 prakticky stejně jako přirozený kofaktor hemin, což se projevuje výrazným nárůstem její odolnosti proti štěpení thermolysinem ve srovnání s apo-cyt b_5 . Tento výsledek podporuje předpoklad, že i analogy heminu se úspěšně váží na aktivní místo v molekule apo-cyt b_5 .

6. Závěr

Výsledky uvedené v práci odpovídají vytyčeným cílům a lze je shrnout následovně:

1. Byla vypracována metoda vhodná pro titrace apo-cyt b_5 heminem i komplexy protoporfyrinu IX s Mn^{III} , Cr^{III} a Co^{III} .
2. Byly změřeny základní spektrální charakteristiky nově připravených derivátů cyt b_5 .
3. Bylo zjištěno, že publikovaná ani modifikovaná metodika pro stanovení konformační stability proteinů pomocí pulzní proteolýzy není vhodná pro stanovení C_m cytochromu b_5 .
4. Bylo provedeno porovnání stability apoformy cyt b_5 vůči holoformě obsahující hemin a také další analogy cytochromu b_5 obsahující protoporfyrin IX s vázaným Mn^{III} , Co^{III} a Cr^{III} . Výsledky ukazují, že analogy cyt b_5 mají prakticky stejnou stabilitu jako nativní forma (holoforma) cyt b_5 , což podporuje předpoklad, že se váží přímo do vazebného místa pro hem a významným způsobem nemění konformaci vlastního polypeptidu ve srovnání s nativním cyt b_5 .

Předkládaná bakalářská práce ověřuje využitelnost nové metodiky (pulzní proteolýzy), dosud nezavedené v laboratoři, pro studium konformační stability proteinů a zároveň přispívá k řešení grantu Grantové agentury České republiky 203/09/0812.

Seznam použité literatury

1. Knejzlík, Z., Káš, J., Ruml, T. (2000) Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chem. Listy*. **94**, 913-918.
2. Stiborová M. (2005) Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace. *Sborník z 1. multioborového semináře „Otevřená věda“, Praha*. **6-9**.
3. Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E. (1999) Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem. Listy*. **93**, 229-237.
4. Omiecinski, C. J., Vanden, H. J. P., Perdew G. P., Peters J. M. (2010) Xenobiotic Metabolism, Disposition, and Regulation by Receptors: From Biochemical Phenomenon to Predictors of Major Toxicities. *Toxicol. Sci.* **120**, 49-75.
5. Dürr, U. H. N., Waskell, L., Ramamoorthy, A. (2007) The cytochromes P450 and b₅ and their reductases--promising targets for structural studies by advanced solid-state NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1768**, 3235-3259.
6. Jancová, P., Anzenbacher, P., Anzenbacherová, E. (2010) Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* **154**, 103-116.
7. Guengerich, F. P. (2006) Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS J.* **8**, 101-111.
8. Omura, T., Sato, R. (1962) A new cytochrome in Liver Microsomes. *J. Biol. Chem.* **239**, 1775-1776.
9. Anzenbacher, P., Anzenbacherová, E. (2001) Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 737-747.
10. Ekroos, M., Sjögren, T. (2006) Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 13682-13687.
11. Guengerich, F. P. (2008) Cytochrome P450 and chemical toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 70-83.
12. <http://pubs.acs.org/cen/news/8229/8229notw6.html> [cit. 5.7.2011].
13. Danielson, P. B. (2002) The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr. Drug Metab.* **3**, 561-597.
14. Stiborová M., Hudeček J., Páca J., Martínek V. (2004) Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chem. Listy*. **98**, 876-890.
15. <http://metallo.scripps.edu/promise/> [cit. 5.7.2011].
16. Schenkman, J. B., Jansson, I. (2003) The many roles of cytochrome b₅. *Pharmacol. Ther.* **97**, 139-152.
17. Kotrbová, V., Aimová, D., Bořek-Dohalská, L., Martínek, V., Stiborová, M. (2009) Preparation of a biologically active apo-cytochrome b₅ via heterologous expression in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **66**, 203-209.
18. Vergères, G., Waskell, L. (1995) Cytochrome b₅, its functions, structure and membrane topology. *Biochimie*. **77**, 604-620.
19. <http://www.medicine-raw-materials.com/Proteins/Cytochrome-b5-%28human%29-/> [cit. 5.7.2011].

20. Zhang, H., Myshkin, E., Waskell, L. (2005) Role of cytochrome b₅ in catalysis by cytochrome P450 2B4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 499-506.
21. Tamburini, P.P., White, R. E., Schenkman, J. B. (1985) Chemical characterization of protein-protein interactions between cytochrome P-450 and cytochrome b₅. *J. Biol. Chem.* **260**, 4007-4015.
22. Kotrbová, V., Mrázová, B., Moserová, M., Martínek, V., Hodek, P., Hudeček, J., Frei, E., Stiborová, M. (2011) Cytochrome b(5) shifts oxidation of the anticancer drug ellipticine by cytochromes P450 1A1 and 1A2 from its detoxication to activation, thereby modulating its pharmacological efficacy. *Biochem. Pharmacol.* **82**, 669-680.
23. Šípal, Z. a kol. (1992) Biochemie, Státní pedagogické nakladatelství, Praha.
24. <http://chemistry.about.com/od/organicchemistryglossary/g/Chelate-Definition.htm> [cit. 5.7.2011].
25. Murray, K. R. a kol. (český překlad, Kraml, J.) (1998) Harperova biochemie, H+H, Jinočany.
26. Voet, D, Voetová, J. G (český překlad, Kotyk A. a kol.) (1995) Biochemie, Victoria Publishing, Praha.
27. Káš, J. a kol. (2005) Laboratorní techniky biochemie, vydavatelství VŠCHT, Praha.
28. Magliery, T.J., Lavinder, J.J., Sullivan, B.J. (2011) Protein stability by number: high-throughput and statistical approaches to one of protein science's most difficult problems. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **15**, 443-451.
29. Jurga, V., Kodíček, M. (2010) Limitovaná a pulzní proteolýza lidského hemoglobinu. *Chem. Listy.* **104**, 232-235.
30. Park, Ch., Marqusee, S. (2005) Pulse proteolysis: a simple method for quantitative determination of protein stability and ligand binding. *Nat. Methods.* **2**, 207-212.
31. Park, Ch., Marqusee, S. (2006) Quantitative determination of protein stability and ligand binding by pulse proteolysis. *Curr. Protoc. Protein. Sci.*, Unit 20.11.
32. Bárta, Čurn, V., Bártová, V. (2010) Analýza proteinů pomocí automatické čipové elektroforézy experion a porovnání s metodou SDS-PAGE. *Chem. Listy.* **104**, 33-40.
33. Abramoff, M.D ., Magalhaes, P.J., Ram, S.J. (2004) Image Processing with ImageJ. *Biophotonic International.* **11**, 36-42.
34. L D Gruenke, Sun, J., Loehr, T.M., Waskell, L. (1997) Resonance Raman spectral properties and stability of manganese protoporphyrin IX cytochrome b₅. *Biochemistry.* **36**, 7114-7125.
35. Yon, J.M. (2001) Protein folding: a perspective for biology, medicine and biotechnology. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **34**, 419-435.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka